

**T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI**

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANISI OLAN 18-60 AY ARASI ÇOCUKLARIN  
MİRNA DÜZEYLERİNİN, KARDEŞLERİYLE VE KONTROL GRUBU İLE  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**DR. HÜLYA KARAGÖZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA, 2022**



**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANISI OLAN 18-60 AY ARASI ÇOCUKLARIN**  
**MİRNA DÜZEYLERİNİN, KARDEŞLERİYLE VE KONTROL GRUBU İLE**  
**KARŞILAŞTIRILMASI**

**DR. HÜLYA KARAGÖZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN: PROF. DR. ÖMER FARUK AKÇA**

**KONYA, 2022**

## ÖZET

# OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANISI OLAN 18-60 AY ARASI ÇOCUKLARIN MİRNA DÜZEYLERİNİN, KARDEŞLERİYLE VE KONTROL GRUBU İLE KARŞILAŞTIRILMASI

HÜLYA KARAGÖZ, UZMANLIK TEZİ, KONYA 2021

**Amaç:** Bu çalışmada okul öncesi dönem otizmlili bireylerin ve kardeşlerinin dolaşımındaki 7 miRNA'nın (miRNA-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miRNA-151a-3p, miRNA-125a, miRNA 28-3p) düzeyinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması ve bu miRNAların otizm şiddeti, davranış sorunları ve kardeşlerde bulunanotistik trait özellikler üzerine olan etkisinin araştırılması planlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya hasta grubu olarak Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve Ruhsal Bozuklukların Tanısal Elkitabı, Beşinci Baskı (DSM-5) tanı ölçütlerine göre OSB tanısını almış 18-60 ay arası 35 çocuk ve OSB tanısı olmayan kardeşleri alınmıştır. OSB olan katılımcıların OSB semptom şiddeti Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (CARS) ve Otizm Davranış Kontrol Listesi (ABC)ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna Meram Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Polikliniği'ne başvuran 18-60 ay arası olup, muayenede kardiyolojik rahatsızlık tespit edilmeyen 30 gönüllü alınmıştır. Katılımcılardan venöz kan alınmıştır. Hasta grubunun ebeveynleri OSB çocuklar için Sorun Davranış Kontrol Listesi, kardeşleri için Çocuklar İçin Otizm Spektrum Tarama Ölçeğini doldurmuşlardır. Alınan periferik kan örneklerinde RT-PCR miRNA(miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miR-151a-3p, miR-125a, miR- 28-3p) ekspresyon analizleri yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmamızdamir-106a-5p, miR-151a-3p, miR- 28-3p hasta grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük eksprese edilmiştir. Ancak yapılan regresyon analizleri sonucunda istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır. miR-23a ile Otizm Davranış Kontrol Listesinin Duyusal alt ölçeği arasında pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. MiR-146a ile Otizm Spektrum Tarama Ölçeği arasında pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. MiR-151a ses hassasiyeti ile, MiR-28 ekolali ile ilişkili bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızda, literatürdebiyobelirteç olmaya aday gösterilen mi-RNA lar çalışılmıştır. Çalışılan mi-RNA lar gruplar arasında farklı eksprese edilmesine rağmen hasta ve sağlıklı grupları ayırt etmekte anlamlı bulunmamıştır. Bu konuda yapılacak yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Otizm spektrum bozukluğu, MikroRNA, miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a-5p, miR-151a-3p, miR-125a, miR-28-3p.

**ABSTRACT**  
**COMPARISON OF MIRNA LEVELS OF CHILDREN BETWEEN 18-60 MONTHS  
DIAGNOSED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER WITH THEIR SIBLINGS  
AND CONTROL GROUP**

**HÜLYA KARAGÖZ, THESIS, KONYA 2021**

**Objective:** In this study, it was planned to compare the levels of 7 miRNAs (miRNA-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miRNA-151a-3p, miRNA-125a, miRNA 28-3p) in the circulation of preschool children with autism and their siblings with healthy controls and to investigate the effects of these miRNA levels on autism severity, behavioral problems and autistic traits in siblings.

**Method:** The study group included 35 children aged 18-60 months and their siblings who applied to the Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Child and Adolescent Psychiatry Department outpatient clinic and were diagnosed with ASD according to DSM-5 diagnostic criteria. ASD symptom severity of participants with ASD was assessed with the Childhood Autism Rating Scale (CARS) and Autism Behavior Checklist (ABC). The control group included 30 volunteers aged between 18-60 months who applied to Meram Medical Faculty Pediatric Cardiology Polyclinic and did not have any cardiologic disease in the examination. Venous blood was collected from the participants. Parents of the participants completed the Problem Behavior Checklist for children and Autism Spectrum Screening Scale for Children. RT-PCR miRNA (miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miR-151a-3p, miR-125a, miR-28-3p) expression analyzes were performed in peripheral blood samples.

**Results:** In our study, miR-106a-5p, miR-151a-3p, and miR-28-3p were expressed lower in the patient group than in the control group. However, as a result of the regression analysis, statistical significance could not be reached. A positive correlation was found between miR-23a and the Sensory subscale of the Autism Behavior Checklist. A positive correlation was found between MiR-146a and Autism Spectrum Screening Scale. It was found that miR-151a correlated with sound sensitivity and MiR-28 correlated with echolalia.

**Conclusion:** In our study Mi-RNAs, which were previously suggested to be biomarkers in the literature, have been studied. Although the analyzed Mi-RNAs were expressed differently between groups, it was not found to be significant in distinguishing the patient and healthy groups. Further studies are needed about this subject.

**Keywords:**Mikro RNA, miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a-5p, miR-151a-3p, miR-125a, miR-28-3p.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tamamlanmasında ve değerlendirilmesinde büyük katkı sağlayan, henüz tıp öğrencisi iken çocuk psikiyatrisini sevmemi ve bu alanı tercih etmemi sağlayan, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ömer Faruk Akça' ya;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Ayhan Bilgiç'e, Dr. Öğr. Üyesi Necati Uzun'a ve Dr. Öğr. Üyesi Semih Erden'e

Erişkin psikiyatri rotasyonum sırasında eğitimime katkıda bulunan başta birlikte birebir çalışma imkanı bulduğum Prof. Dr. Mehmet Ak ve Prof. Dr. Rahim Kucur olmak üzere erişkin psikiyatrisi kliniğinde görev yapan tüm hocalarıma, Çocuk Nöroloji rotasyonum sırasında klinik ve akademik tecrübelerini paylaşarak eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Ahmet Sami Güven ve Prof. Dr. Hüseyin Çaksen'e;

Çalışmamıza kontrol grubu almamızda tüm içtenliği ile yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet Burhan Oflaz'a;

Tezimin genetik araştırmalarının tüm aşamalarında yardımcı olan Prof. Dr. Mahmut Selman Yıldırım ve Prof. Dr. Ayşegül Zamani' ye

Asistanlık süreci boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, tüm psikologlarımıza; hemşirelerimize, sekreterlerimize ve personelimize;

Asistanlıkta tanıştığım, kişilik gelişimimde önemli katkıları olan ve her zaman hatırlayacağım Fadime Şimşek ve Zakire Kübra Aksoy'a

Tez çalışmama katılan bütün çocuklara ve ailelerine;

Tanıdığım günden beri desteği, içtenliği, sabrı ve sevgisi ile hep yanımda olan sevgili eşim Ahmet Selim Karagöz'e

Doğumuyla beraber annelik ve hekimlik kimliğimi birleştirmemi sağlayıp her zaman moral ve sevinç kaynağım olan sevgili kızım Zeynep Ela Karagöz'e

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr. Hülya Karagöz

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLO VE ŞEKİLLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>x</b>
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU .....	2
2.1.1.Tanım, Tarihçe ve Tanı Ölçütleri.....	2
2.1.2.Epidemiyoloji.....	5
2.1.3. Etyoloji.....	6
2.1.4. Eşlik Eden Psikiyatrik Durumlar .....	12
2.2. Mİ-RNA .....	14
2.2.1. mi-RNA-125b .....	16
2.2.2. mi-RNA-125a .....	16
2.2.3. mi-RNA-146a-5p .....	17
2.2.4. mi-RNA-106a-5p .....	19
2.2.5. mi-RNA-23a-3p .....	19
2.2.6. mi-RNA-28-3p .....	20
2.2.7. mi-RNA-151a-3p .....	21
2.3. ÇALIŞMANIN HİPOTEZLERİ .....	22
<b>3. YÖNTEM VE ARAÇLAR</b> .....	<b>22</b>
3.1. ÖRNEKLEM .....	22
3.2. YÖNTEM .....	23
3.3. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	24
3.3.1. Sosyodemografik veri formu .....	24
3.3.2. Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ).....	24
3.3.3. Otizm Davranış Kontrol Listesi (ABC) .....	25
3.3.4. Sorunlu Davranışlar Kontrol Listesi (SDKL) .....	25
3.3.5. 6-18 Yaş Aralığındaki Çocuklarda Otizm Spektrum Tarama Ölçeği .....	25
<b>4. ETİK</b> .....	<b>26</b>
<b>5.UYGULAMA</b> .....	<b>26</b>
5.1.EKSPRESYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER .....	27
5.1.1 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR, RT-qPCR) .....	27
5.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....	27

5.2. UYGULAMA ADIMLARI .....	28
5.2.1. Plazma Eldesi .....	28
5.2.2. miRNA İzolasyonu .....	29
5.2.3. miRNA 'lardan cDNA Eldesi .....	30
5.2.4. Real Time PCR .....	31
<b>6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....</b>	<b>32</b>
<b>7. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
7.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ .....	33
7.2. GRUPLARIN MİKRO RNA DÜZEYLERİ VE OTİZM GRUBUNUN ÖLÇEK PUANLARI .....	34
7.3. GRUPLARININ Mİ RNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI .....	35
7.4. MİKRO RNA DÜZEYLERİNİN VE ÖLÇEK PUANLARININ KORELASYON ANALİZİ .....	37
7.5. MULTİNOMİNAL LOJİSTİK REGRESYON ANALİZİ .....	40
<b>8. TARTIŞMA .....</b>	<b>42</b>
<b>9. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>47</b>
<b>10. KAYNAKLAR .....</b>	<b>48</b>

## **TABLO VE ŞEKİLLER**

**Tablo 1.cdna mix içeriği**

**Tablo 2.cdna için gereken süre**

**Tablo 3.BrightGreenMastermix ve U6 primermastermix içeriği**

**Tablo 4. Real time PCR ısı protokolü**

**Tablo 5. Cinsiyet dağılımı**

**Tablo 6. Grupların Yaş Dağılımı**

**Tablo 7.Grupların Mikro RNA Düzeyleri ve Otizm Grubunun Ölçek Puanları**

**Tablo 8. Grupların mi-RNA düzeylerinin karşılaştırılması**

**Tablo 9. MİR106a 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri için Post hoc analiz**

**Tablo 10. MİR151a 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri için Post hoc analiz**

**Tablo 11. MİR28 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri için Post hoc analiz**

**Tablo 12. Mi RNA ların birbirleri ile ve ölçeklerle olan korelasyonu**

**Tablo 13. Kardeş grubunun mi-RNA düzeylerinin Otizm Spektrum Tarama Ölçeği ile korelasyonu**

**Tablo14. Otizm grubunda anlamlı bulunan mi-RNA düzeylerinin CARS ölçeğinin alt maddeleri ile korelasyonu**

**Tablo 15.miR- 106a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 16.miR- 125b, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 17.miR- 151a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 18.miR- 28, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 19.miR- 125a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 20.miR- 23a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

**Tablo 21.miR- 146a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

## **KISALTMALAR**

- ABC**Otizm Davranış Kontrol Listesi
- Cadm2**Nöral Hücre Adezyon Molekülü 2
- CARS**Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği
- CHL1**Close Homolog of L1
- CNV**Kopya Sayısı Varyasyonu
- CT**Thresholdcycle, Döngü Eşiği
- DA** Dopamin
- DAT**Dopamin Taşıyıcı
- DEHB**Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
- DTI**Difüzyon Tensör Görüntüleme
- DZ**Dizigotik
- DM**Duchenne kas distrofisi
- EGF**Epidermal Büyüme Faktörü
- FAK**Fokal Adezyon Kinaz
- GABA** $\gamma$ -aminobütirik asit
- GAD**Glutamik Asit Dekarboksilazı
- Glu**Glutamat
- IRAK1**İnterlökin-1 Reseptörü ile İlişkili Kinaz
- miR, mi-RNA:** Mikro RNA
- MGDPs**MüllerGliadan Üretilmiş Progenitör
- MR**Manyetik Rezonans Görüntüleme
- MZ**Monozigotik
- NCAM**Nöral Hücre Adezyon Molekülü
- NDMARN**-metil-D-aspartat Reseptörü
- NF**Nörofibromatozis

**NRXN**Neurexinler

**NLGN**Neurologinler

**OKB**Obsesif Kompulsif Bozukluk

**OSB**Otizm Spektrum Bozukluğu

**OSTÖ**Otizm Spektrum Tarama Ölçeği

**PCOS**PolikistikOver Sendromu

**RT-qPCR**Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**PET**Pozitron Emisyon Tomografisi

**SDKL**Sorunlu Davranışlar Kontrol Listesi

**SFKS**rc Ailesi Kinaz

**SNP**Tek Nükleotit Varyasyonu

**TLR**TollLike Reseptör

**5-HT** Serotonin

**ZK**Zihin Kuramı

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), çok erken yaşlarda başlayan, kalıtlabilirliği yüksek olan, iletişim ve sosyal engelliliklerle karakterize nörogelişimsel bir rahatsızlıktır(Tonacci ve ark. 2019). Çok sayıda ailesel çalışma OSB'nin kalıtsal bir hastalık olduğunu göstermiştir(Le Couteur ve ark., 1995)(Pickles ve ark. 1995) ve genetik faktörlerin OSB riskinin % 50-60'ını oluşturduğu tahmin edilmektedir(Gaugler ve ark., 2014). İkiz çalışmalarında, konkordans oranı monozigotik ikizlerde %36-96, dizigotik ikizlerde %0-27 arasında olup; monozigotlardan dizigotik ikizlerden on kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. İkiz olmayan kardeşler arası konkordans %16 olarak bulunmuştur. Bu da genetik etmenler dışında çevresel ve prenatal etmenlerin rolünü vurgulamaktadır(Bohm ve ark., 2013). Çevresel faktörlerin, histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve mikroRNA'lar (miRNA) gibi epigenetik mekanizmalar yoluyla etki edebileceği varsayılmaktadır (Issler ve ark., 2015).

Biyobelirteçlerin, hastalık tanılamada giderek daha fazla önem kazandığı, ilaç keşiflerine olanak sağladığı ve çeşitli hastalıkların ilerlemesini önlediği bilinmektedir(Blaus ve ark., 2015). OSB de erken tanımlayıcılara duyulan ihtiyaç çok önemlidir, çünkü daha önce ilaçla ya da davranışçı terapi yoluyla erken müdahalenin bazı semptomları ortadan kaldıracabileceği ve yaşam kalitesini artırabileceği gösterilmiştir.Sonuç olarak, OSB'nin erken teşhisi veya tahmini için güvenilir biyobelirteçlerin keşfine ihtiyaç vardır (Shenoy ve ark.,2017).

MiRNA düzensizliğinin nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir(Geaghan ve ark., 2015)(Sun ve Shi, 2015). Son çalışmalar,miRNA'ların OSB patogenezinde de rol oynadığını göstermiştir(Schepici ve ark., 2019).Urduingio ve ark. (2010), MiRNA-146a ve miRNA-146b'nin OSB etyopatogenezinde rol oynadığını göstermiştir.OSB hastalarının olfaktor mukoza kök hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışma, miR-146a'nın OSB hastalarında farklı eksprese edildiğini ortaya koymuştur(Nguyen ve ark., 2016). Yakın tarihli bir derlemede miR-23 ile ilgili yapılan 5 çalışmada, miR-106 ile ilgili yapılan 3 çalışmada OSB'li bireylerde düzensizlikler olduğu bildirilmiştir(Hu ve ark., 2017). 2016 yılında yayınlanan, 219 hedef miRNA'yı kapsayan bir derlemede düzensiz olan 27 miRNA tanımlanmıştır. Üç miRNA'nın, (miR-23a-3p, miR-146a-5p ve miR-106b-5p) tutarlı düzensizlik gösterdiği belirtilmiştir(Hicks ve Middleton, 2016). Yakın tarihli OSB'li, gelişim gecikmesi olan ve normal kontrollerden oluşan geniş örneklemlerli bir çalışmada 14 miRNA'nın tükürük düzeylerinin, kontrollerden farklılaştığı, en önemli farkın miRNA 28-3p için olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada miR-151a-3p, miR-125b-2-3p'nin hasta grubunda daha az

eksprese edilme eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2020). miR-106a-5p, ADOS-II'deki kısıtlayıcı / tekrarlayıcı davranışlarla ilişkili bulunmuştur (Hicks ve ark., 2020).

Frajil-x, OSB ile sık birliktelik gösteren genetik hastalıklardandır. Yakın zamanda yapılan, frajil-x sendromlu hastaların ve kontrol grubunun idrarlarındaki miRNA düzeylerini araştıran bir çalışmada, miRNA125a'nın hasta bireylerin idrarlarında anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır(Putkonen ve ark., 2020).

Literatür gözden geçirildiğinde OSB ile mi-RNA'lar arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar olmasına rağmen,OSB'li bireylerin kardeşlerini,OSB'li bireyler ve sağlıklı kontrollerle,periferik kandaki miRNA düzeyleri açısından karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Toplumda otistik özellikler gösterme açısından en riskli grupların yine otistik bireylerin yakın akrabaları olduğu bilinmektedir.Kardeş grubu oluşturarak, otistik traitözellikler gösterebilen ancak hasta olmayan gruplardaki, mi-RNA düzeylerinin sağlıklı gruba göre nasıl değiştiğini ortaya koymak, riskli gruplardaki risk oranının tespiti açısından önemlidir. Yine olabildiğince benzer genetik ve çevresel faktöre sahip olan kardeşlerdeki epigenetiksel farkı daha iyi anlayabilmek, OSB patogenezi ışık tutmak açısından fayda sağlayabilir. Ayrıca bu konuda yapılan çalışmalar arasında erken dönem OSB'li bireyleri içeren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. OSB'nin nörogelişimsel süreçle bağlantılı olduğu ve yaşla birlikte fizyopatolojisinde farklılıkların bildirildiği (Sroufe, 2009)düşünüldüğünde, daha önce tespit edilen Mi-RNaların erken dönem OSB tanısı olan çocuklarda da sağlıklı kontrollerden farklı olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada,daha önceki çalışmalarda tutarlı olarak farklı eksprese edilen miRNAlar ile frajil-x sendromlu bireylerde farklı eksprese edilen, toplamda 7 miRNA'nın (miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miR-151a-3p, miR-125a, miR-28-3p),okul öncesi dönem otizmli bireyler ve kardeşlerinin dolaşımındaki düzeyi sağlıklı kontrollerle karşılaştırılacaktır.Ayrıca bu miRNA düzeylerinin otizm şiddeti ve davranış sorunları üzerine olan etkisi araştırılacaktır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU**

#### **2.1.1.Tanım, Tarihçe ve Tanı Ölçütleri**

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal iletişimde eksiklikler, sınırlı ilgi ve tekrarlayıcı davranışların varlığı ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur.

'Otizm' ve 'otistik' kelimeleri Yunanca 'da benlik, öz, kendi gibi anlamlara gelen 'otos' sözcüğünden türetilmiştir. 'Otizm' terimini ilk kez İsveçli psikiyatrist Eugen Bleuler 1910'larda kendisini dış dünyadan tümüyle soyutlamış olan bir birey için kullanmıştır (İftar, 2013).

Leo Kanner (1943), yaşları 2-11 arasında değişen on bir vakayı ayrıntılarıyla anlatan "Duygusal Temasın Otistik Bozuklukları" başlıklı bir rapor yayınlamıştır (Kanner, 1943). Kanner, bu durumu, bebeklik döneminden itibaren varolan, başkalarıyla ilişki kurma konusunda aşırı yetersizlik olarak tanımlamıştır. Kanner ayrıca dilin pragmatik kullanımında başarısızlık, ekolalik konuşma eğilimi ve kelimeleri sadece gerçek anlamı ile anlama şeklinde kendini gösteren, olağandışı dil gelişimini gözlemlemiştir.

1944'te Hans Asperger, "otistik psikopati" olarak isimlendirdiği klinik durumu açıklayan bir makale yayınlamıştır. Bu makale, sözlü olmayan iletişim ve sosyal becerilerde zorluk yaşayan çocukları tanımlamıştır. 1981'de Lorna Wing, "psikopati" çağrışımlarını ortadan kaldırmak için bu durumu "Asperger sendromu" olarak yeniden adlandırmıştır. Wing, Asperger Sendromunun ilk tanı kriterlerini ortaya koymuştur (Masi ve ark., 2017).

'İnfantil otizm' ilk olarak Ruhsal Bozuklukların Teşhis ve İstatistik El Kitabının, üçüncü baskısında (DSM-III) yaygın gelişimsel bozukluğun bir alt grubu olarak tanımlanmıştır (Volkmar ve ark., 1986). İnfantilotizm için kriterler; semptomların 30 aydan önce başlaması, sosyal becerilerde yetersizlik olması, dil gelişiminde eksiklikler olması ve şizofreni olmaksızın çevresel uyaranlara tuhaf yanıtlar verilmesi şeklinde tanımlanmıştır. DSM-III-R'de İnfantil Otizm "Otistik Bozukluk" olarak adlandırılmıştır, teşhis için gerekli 16 olası kriterden 8'i yeterli sayılmıştır. Başlangıç yaşının 30 aydan küçük olma şartı kaldırılmıştır. (Masi ve ark., 2017).

DSM-IV, Otistik Bozukluğun teşhisi için DSM-III-R'ye benzer kriterlerle 1994 yılında piyasaya sürülmüştür, ancak başlangıç yaşına göre yapılan ayırım kaldırılmıştır. DSM-IV, Wing tarafından özetlenen bazı kriterleri kullanarak Asperger Sendromu için resmi bir kriter seti ortaya koymuştur. Asperger Sendromu kriterleri, sosyal etkileşim, iletişim ve hayal gücünde bozuklukların olduğu, ancak dil veya bilişte bozuklukların olmadığı bir durum olarak tanımlanmıştır (APA, 1994).

2013 yılında yayınlanan DSM-5, OSB tanısını daha kolay hale getirmeyi amaçlamıştır. Artık iki alana (sosyal iletişim ve sınırlı, tekrarlayan veya olağandışı duyuşal-motor davranışlar) dayalı tek bir otizm spektrumu tanımlanmıştır. Aspergersendromu ve başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk gibi, klinisyenler tarafından güvenilmez bulunan alt tipler, artık tek OSB teşhisi altında tanımlanmaktadır (APA, 2013).

### **DSM 5 Otizm Tanı Kapsamında Bozukluk Tanı Ölçütleri (Köroğlu, 2013)**

**A.** O sırada ya da öyküden alınan bilgilere (ayrıntılardan çok örnekleyen) göre, aşağıdakilerle kendini gösteren, değişik biçimleriyle toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimde süregiden eksiklikler:

(1). Sözelimi, olağandışı toplumsal yaklaşım ve karşılıklı konuşamadan, ilgilerini, duygularını ya da duygulanımını paylaşamamaya, toplumsal etkileşimi başlatamamaya ya da toplumsal etkileşime girememeye dek değişen aralıkta toplumsal-duyuşal karşılıklık eksikliği.

(2). Sözelimi, sözel ve sözel olmayan tümleşik etkileşim yetersizliğinden, göz iletişimi ve beden dilinde olağandışılıklara ya da el-kol devinimlerini anlama ve kullanma eksikliklerine, yüz ifadesinin ve sözel olmayan iletişimin hiç olmamasına dek değişen aralıkta, toplumsal iletişim için kullanılan sözel olmayan iletişim davranışlarında eksiklikler.

(3). Sözelimi, değişik toplumsal ortamlara göre davranışlarını ayarlama güçlüklerinden, imgesel oyunu paylaşma ya da arkadaş edinme güçlüklerine, yaşlılarına ilgi göstermemeye dek değişen aralıkta, ilişkiler kurma, ilişkilerini sürdürme ve ilişkileri anlama eksiklikleri.

**B.** O sırada ya da öyküden alınan bilgilere (ayrıntılardan çok örnekleyen) göre, aşağıdakilerden en az ikisi ile kendini gösteren, sınırlı, yineleyici davranış örüntüleri, ilgiler ya da etkinlikler:

(1). Basmakalıp ya da yineleyici devinsel (motor) eylemler, nesne kullanımları ya da konuşma (örn. yalın devinsel basmakalıp davranış örnekleri, oyuncakları ya da oynar nesneleri sıraya dizme, yankılama (ekolali), kendine özgü deyişler).

(2).Aynılık konusunda direnme, sıradanlık dışına esneklik göstermeme ya da törensel sözel ya da sözel olmayan davranışlar (örn. küçük değişiklikler karşısında aşırı sıkıntı duyma,

geçişlerde güçlük yaşama, katı düşünce örüntüleri, törensel selamlama davranışları, her gün aynı yoldan gitmek ya da aynı yemeği yemek isteme).

(3). Yoğunluğu ya da odağı olağandışı olan, ileri derecede kısıtlı, değişkenlik göstermeyen ilgi alanları (örn. alışılmadık nesnelere aşırı bağlanma ya da bunlarla uğraşıp durma, ileri derecede sınırlı ya da saplantılı ilgi alanları).

(4). Duyusal girdilere karşı çok yüksek ya da düşük düzeyde tepki gösterme ya da çevrenin duysal yanlarına olağandışı bir ilgi gösterme (örn. ağrı/ısıya karşı aldırıışsızlık, özgül birtakım seslere ya da dokulara karşı ters tepki gösterme, nesnelere aşırı koklama ya da nesnelere aşırı dokunma, ışıklardan ya da devinimlerden görsel büyülenme).

C. Belirtiler erken gelişim evresinde başlamış olmalıdır (toplumsal gerekler sınırlı yeterliğin üzerine çıkana dek tam olarak kendini göstermeyebilir ya da daha sonraki yıllarda, öğrenilen yöntemlerle maskelenebilir).

D. Belirtiler, toplumsal, işle ilgili alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında klinik açıdan belirgin bir bozulmaya neden olur.

E. Bu bozukluklar, anlıksalyetiyitimi (anlıksal gelişimsel bozukluk) ya da genel gelişimsel gecikme ile daha iyi açıklanamaz. Anlıksalyetiyitimi ve otizm açılımı kapsamında bozukluk sıklıkla bir arada ortaya çıkar. Otizm açılımı kapsamında bozukluk ve anlıksalyetiyitimi tanı koymak için, toplumsal iletişim, genel gelişim düzeyine göre beklenenin altında olmalıdır.

### **2.1.2.Epidemiyoloji**

OSB’de yapılan ilk epidemiyolojik çalışmada, OSBprevalansı 4.5/10.000 olarak bildirilmiştir (Lotter, 1966). Tanı kriterlerinin yenilenmesiile bildirilen OSB sıklığında dramatik bir artış gerçekleşmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nin “Hastalıkları Kontrol Merkezi” OSB prevalansını 2006 yılında 1/150, 2008’de 1/88, 2012 yılında 1/68 olarak bildirmiştir (CDC, 2012). Güney Kore de yapılan epidemiyolojik çalışmada OSB prevelansı % 2.64 olarak saptanmıştır(Kim ve ark., 2011).Türkiye’de OSB sıklığı tam olarak bilinmemekle beraber,Millî Eğitim Bakanlığı’nın 2014 verilerine göre zorunlu eğitim çağında 16.837 OSB’li çocuk bulunduğu bilinmektedir. Tanı kriterlerinin değiştirilmesi, hastalık hakkındaki farkındalığın artması, çevre kirliliğinin ve ileri anne baba yaşının artmasıOSB prevalansının artmasına sebep olarak gösterilmiştir(Palinkas ve ark., 2019)(Mukaddes, 2018).

OSB'nin erkeklerde daha yaygın olduğu bilinmekle beraber(Tartaglia ve ark., 2017) yakın tarihli bir meta-analizde gerçek erkek-kadın oranının, daha önce bildirilen 4: 1 oranından 3: 1'e daha yakın olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ayrıca, OSB tanı kriterlerini karşılayan kızların klinik tanı almama riskinin daha yüksek olduğunu ileri sürmüştür. Kadınlardaki otizm fenotipinin, hastalığıyanlış veya geç teşhis edilmesinde rol oynayabileceği bildirilmiştir(Tartaglia ve ark., 2017).

### **2.1.3.Etyoloji**

Otizm spektrum bozukluğunun sebepleri henüz tam olarak bilinmemekle beraber pek çok faktörün rolü olduğu, bunun içinde en önemli faktörün genetik nedenler olduğu düşünülmektedir (Mukaddes, 2017).

#### **2.1.3.1. Genetik**

OSB'nin psikiyatrik hastalıklar içerisinde genetik geçişi en yüksek olan hastalıklardan biri olduğu bilinmektedir. OSB'de genetik etiyojinin rolü ilk olarak 1970'lerde ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada öne sürülmüştür. Daha sonraki yıllarda yapılan ikiz çalışmalarında dizigotik ikizlere (%5-40) kıyasla, monozigotik ikizlerde (%60-90) daha yüksek konkordans saptanarak (Colvert ve ark., 2015) OSB'nin kalıtılabilirliğine ek kanıtlar sağlanmıştır. Ayrıca OSB'de kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) yaklaşık %15 ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) %7 oranında etyopatogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (Masini ve ark., 2020).

OSB'de spesifik bir gen tanımlanamamasına rağmen 1,2,3,7,15,16,17 ve 22. kromozomlardaki varyasyonların otizmle ilişkisi gösterilmiştir (Bergbaum ve Ogilvie, 2016). OSB'de etkilenen genlerin; kromatinin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel regülasyon, hücre proliferasyonu, sinaptik mimari ve işlevsellikte yer alan proteinleri kodladığı gösterilmiştir (Masini ve ark., 2020). Neurexinler (NRXN) ve neuroliginler (NLGN), sinaptik fonksiyon için çok önemli transmembran sinaptik proteinlerdir. OSB'li bireylerde NRX1'deki işlev kaybına yol açan varyantlar birçok çalışmada tanımlanmıştır (H. G. Kim ve ark., 2008). CASPR2 olarak da bilinen CNTNAP2, esas olarak nöronal ve glial hücreler arasında bir yapışma proteini olarak işlev görmektedir. Bu proteinin, ekspresyonunun azalmasına neden olan CNV'ler OSB'li hastalarda saptanmıştır (Arking ve ark., 2008). SHANK gen ailesi, OSB için güçlü bir aday olarak önerilmiştir. SHANK proteinleri, nörotransmitter reseptörlerini, iyon

kanallarını ve diğer membran proteinlerini, hücre iskeleti aktinine ve sinyal proteinlerine bağlayan post sinaptik yoğunluk proteinleridir. Bu proteinler, sinaps oluşumunda ve dendritikomurga olgunlaşmasında önemli bir rol alır. OSB'li bireylerde SHANK2 geninde fonksiyon kaybına neden olan de novo varyantlar tanımlanmıştır (Berkel ve ark., 2010).

Ayrıca; OSB hastalarının yaklaşık %5-10'unda aynı anda ortaya çıkan monogenik sendromlar bildirilmiştir. OSB ile ilişkili en yaygın sendromun, OSB'li bireylerin yaklaşık %1,5-3'ünde teşhis edilen frajil-x sendromu olduğu bilinmektedir. OSB ile ilişkili olan diğer sendromların, tüberoskleroz (TSC), Rett sendromu (MECP2), nörofibromatozis tip 1 (NF1 geni), Duchenne kas distrofisi (DMD geni) ve Timothy sendromu (CACNA1C geni) olduğu bilinmektedir (Wiśniowiecka-Kowalnik ve Nowakowska, 2019).

### **2.1.3.2. Nöroanatomik Değişiklikler**

Bugüne kadar yapılan nörogörüntüleme çalışmalarında, OSB'li bireylerde, nöroanatomik olarak; bölgeye özgü hacimsel değişiklikler, gri ve beyaz cevherdespesifik değişiklikler, farklı beyin bölgelerinin longitudinal bağlantı yollarında bazı değişiklikler ve hücresel yapıda bazı farklılıklar tespit edilmiştir (Donovan ve Basson, 2017).

Bölgesel hacmi değerlendiren çalışmalarda, erken dönemde frontal korteksin aşırı büyüdüğü ve ardından beyin boyutlarında belirgin bir azalma olduğunu bildirilmiştir (Courchesne ve ark., 2011). Yine hacimle ilgili çalışmalarda özellikle çocuklarda amigdalanın boyutunda değişiklikler olduğu, OSB teşhisi olan çocuklarda, toplam beyin hacmine göre sağ ve sol amigdala boyutlarının arttığı bulunmuştur (Schumann ve ark., 2009). Hücresel boyuttaki değişiklikleri inceleyen çalışmalarda, Purkinje hücrelerinin boyutunda ve sayısında önemli bir azalma tespit edilmiştir (Fatemi ve ark., 2012). Beyin anatomisinin başka bir yönü, farklı beyin bölgelerinin longitudinal bağlantılarıyla ilgilidir. OSB'de özellikle beynin ön bölgeleriyle serebellum arasındaki bağlantının azaldığı gösterilmiştir (Donovan ve Basson, 2017).

### **2.1.3.3. Nörokimyasal Değişiklikler**

OSB'de pek çok nörotransmitterin rolü olduğu, normal bireylere göre ekspresyonlarında farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir. En çokγ-aminobütirik asit (GABA), glutamat (Glu) serotonin (5-HT) ve dopamin (DA) nin rolü araştırılmıştır.

**GABA :** Harada ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada otizmlilerden oluşan sol frontal lobunda kontrollerle karşılaştırıldığında düşük GABA seviyeleri gözlenmiştir (Harada ve ark., 2011).Postmortemyapılan bir çalışmada, GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptör ekspresyonunun, serebellumda önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur(Blatt ve Fatemi, 2011).

**GLUTAMAT :** OSB, Glu reseptörlerini ve glutamatdekarboksilaz enzimini kodlayan genlerle ilişkilendirilmiştir(Quaak ve ark., 2013).Glu'yuGABA'ya dönüştüren glutamik asit dekarboksilazı kodlayan GAD1 de OSB ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, otizm teşhisi konan deneklerde azalmış glutamik asit dekarboksilaz seviyeleri gözlenmiştir (Yip ve ark., 2007).Yine OSB'li deneklerin kan plazması ve serumundakiglutamat düzeyini inceleyen çalışmada glutamatseviyeleri artmış olarak saptanmıştır(Aldred ve ark., 2003).

**SEROTONIN:** 5-HT taşıyıcı lokusundaki, nadir aleller OSB gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sutcliffe ve ark., 2005). Artmış 5-HT seviyeleri, OSB'li bireyler arasında yaygın olarak tespit edilmiştir ve deneklerin yaklaşık% 25'inde bildirilmiştir (Quaak ve ark., 2013).

**DOPAMİN :** OSB tanısı alan kişilerin dopaminergik sistemlerinde disfonksiyon olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur(McCracken ve ark., 2002). Pozitron emisyon tomografisi (PET) kullanılarak yapılan bir araştırmadaOSB olan deneklerde orbitofrontal kortekste artmış dopamin taşıyıcısı (DAT) seviyeleri bulunmuştur (Nakamura ve ark., 2010). Yine bu bulgularla uyumlu olarak OSB'li hastalarda, artmış DA döngüsünün göstergesi olan homovalinikasinin idrardaki düzeyi artmış görünmektedir(Quaak ve ark., 2013).

#### **2.1.3.4. Çevresel Etmenler**

OSB'de gözlemlenen heterojen fenotipler, genetik olarak duyarlı bireylerde, çevresel risk faktörlerinin; hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığını göstermektedir (Emberti Gialloreti ve ark., 2019).Bu çevresel risk faktörleri prenatal, perinatal ve postnatal olabilmektedir.

#### **Prenatal:**

OSB de, hem ileri anne hem de ileri baba yaşı ( $\geq 35$  yaş) artmış OSB riski ile ilişkili bulunmuştur (Durkin ve ark., 2008). Ayrıca anne ile ilgili olan faktörlerden hemmaternalobezite hem de düşük kilo, artmış OSB riski ile ilişkilendirilmiştir. Maternalobezitenin, immünsistemi aktive ederek fetüste anormal nöronal büyüme ve farklılaşmaya neden olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda, maternal yetersiz beslenmenin de, proinflamatuvar faktörlerin orantısız salınımına yol açarak, nöronal hasara neden olabileceği gösterilmiştir(Emberty Gialloreti ve ark., 2019).Yakın zamanda yapılan bir meta analizde yardımcı üreme tekniği kullanımının da otizm riskini arttırdığı sonucuna varılmıştır (L. Liu ve ark., 2017).

Son yıllarda epidemiyolojik araştırmalar, hava kirliliği, pestisitler, plastik endüstrisinde kullanılan malzemeler ve ağır metaller gibi kimyasal faktörlere, doğum öncesi maruz kalmanın OSB riskini artırabileceğini göstermiştir (Kalkbrenner ve ark., 2014).Antiepileptik ilaçlardan valproatin, OSB açısından en güçlü ilişkiyi gösterdiği bulunmuştur(Emberty Gialloreti ve ark., 2019). Otizm riski ile maternal enfeksiyon arasında;maruz kalma süresine, enfektif ajanın türüne ve maternalimmün tepkinin yoğunluğuna bağlı olarak değişen bir ilişki tespit edilmiştir. Viral enfeksiyonlar ilk trimesterde, bakteriyel enfeksiyonlar ikinci trimesterde, influenza ve ateşli ataklar tüm gebelik boyunca ve özellikle üçüncü trimesterde artmış OSB ile ilişki göstermektedir(Zerbo ve ark., 2013).

Pestisitlerin (herbisitler, böcek öldürücüler, böcek kovucular, antimikrobialler, fungusitler, dezenfektanlar) canlı organizmaları, sinir sisteminde asetilkolinesteraz üretimini inhibe ederek, GABA nörotransmisyonunu değiştirmek suretiyle etkileyebileceği bildirilmiştir(Shelton ve ark., 2012). 2014 yılında yapılan yedi epidemiyolojik çalışmadan oluşan bir incelemede tüm çalışmalar, pestisit sınıfları ve OSB riski arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Kalkbrenner ve ark., 2014).

### **Perinatal**

Çeşitli çalışmalar, sezaryen ve / veya indüklenmiş doğum eylemi ile OSB arasındaki olası ilişkiyi incelemiştir (Dodds ve ark., 2011).Ancak bu konudaki bulgular çelişkilidir.Oksitosinstimulasyonu sırasındaki oksitosin varyasyonlarının OSB etiolojisinde olası bir etkisi olabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda oksitosinerjik sistemin epigenetik düzensizliklerinin de OSB'de rol oynayabileceği belirtilmiştir (Haronyve Wagner, 2011).

### **Gen -Çevre Etkileşimi (Epigenetik)**

Epigenetik mekanizmalar, kromatin yapısını modüle eder ve DNA dizisinde değişiklik olmaksızın birçok genin ekspresyonunu düzenler (Schiele ve Domschke, 2018). Epigenetik düzenlemenin örneklerinden biri DNA metilasyonudur. Çok sayıda genom çalışması, OSB'li bireylerinin beyinlerinde DNA metilasyonunda birden fazla değişiklik olduğunu ortaya koymuştur (Ellis ve ark., 2017). DNA metilasyonundaki bu fark, beyinde eksprese edilen OSB gelişimiyle ilgili olan genlerde tespit edilmiştir. Yazarlar, epigenetik değişikliklerin gametlerin yaşlanmasına bağlı olabileceğini veya erken embriyonik yaşamda ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir (Berko ve ark., 2014).

### **2.1.3.5. Nöropsikiyatrik Kuramlar**

#### **Zihin Kuramı (ZK)**

Günlük sosyal iletişim, diğer kişilerin hedefleri, duyguları, inançları gibi zihinsel durumlarını anlayabilme ve kendi davranışını düzenleme becerisine dayanmaktadır. “Zihin kuramı; inanç, istek, niyet, hayal, duygu gibi zihinsel durumlardan çıkarsama yaparak eylemde bulunmak şeklinde tanımlanmaktadır. Zihin kuramı becerilerinin, normal gelişimsel seyirdedört yaşlarında kazanıldığı düşünülmektedir (Kaysılı ve Bahar, 2013). OSB'li bireylerde, niyet ve duyguların muhakemesinde bozukluklar olduğu bilinmektedir (Boucher, 2012). ZK becerilerindeki bu bozukluklar, davranışların zihinsel durumlardan kaynaklandığının algılanamamasına sebep olur. Bu durumun OSB'li hastalarda sosyal sorunlara yol açtığı düşünülmektedir (Shamsi ve ark., 2019).

Otistik özelliklere sahip bireylerde ZK zayıflamasından sorumlu faktörlerden birinin ayna nöronların disfonksiyonu olduğu düşünülmektedir (Ramachandran ve Oberman, 2006). Ayna nöronlar, hem bir eylemin gerçekleştirilmesi sırasında hem de gerçekleştirilen eylemin gözlemlenmesi sırasında aktive olan, serebral kortekste bulunan işlevsel bir nöron kümesi olarak tanımlanmıştır (Rizzolatti ve Craighero, 2004). Davranış kalıplarını aynalama yeteneklerinden ötürü bu şekilde tanımlanmışlardır. Ayna nöronların, kişilerin, eylemlerin arkasındaki niyetleri anlamalarını sağladığı bildirilmiştir (Fogassi, 2005). Bu nöron grubu esas olarak inferior frontal korteks, premotor korteks, birincil somatosensoriyel korteks ve alt parietal kortekste bulunur (Molenberghs ve ark., 2009) ve insanlarda ZK ile ilişkili olduğu varsayılır (Gallese ve ark., 2004). OSB'li bireylerin yukarıda belirtilen tüm alanlarda

bozulmalar göstermesi nedeniyle, OSB'de ayna nöron sisteminin işlevsiz olduğu ileri sürülmüştür (Oberman ve Ramachandran, 2007).

### **Zayıf Merkezi Bütünleştirme**

Merkezi bütünleme, gelen bilgiyi kendi bağlamında işleme yeteneği olarak tanımlanmıştır(Hill ve Frith 2003). Zayıf merkezi bütünleme durumunda, gelen uyarının anlam oluşturmayacak şekilde parça parça işlendiği düşünülmektedir(Happé, 1999). Bu durumun; normal gelişen bireylerin hikâyeninözünü anlatırken, otizm spektrumunda olan insanların, hikayenin bütününe değil, ayrıntılarını veya tam sözlerini hatırlamalarına yol açabileceği düşünülmüştür(Hill ve Frith, 2003). Merkezi bütünleme yeteneğinin, altta yatan nöro-fizyolojik süreçleri henüz tam açıklanamamıştır.Ancak sinaptik budanma başarısızlığından dolayı ya dayukarıdan aşağıya modülasyon süreçlerinde beynin üst bölümleri ve alt bölümleri arasındaki zayıf bağlantı nedeniyle olabileceği varsayılmıştır(Happé, 1999).

### **Yürütücü İşlevler**

Otizmdeki davranışsal problemlerin bazıları için bilişsel bir açıklama olarak yürütücü işlev bozukluğu teorisi ortaya atılmıştır.Yürütme işlevi, çalışma belleğinin planlanması, dürtü kontrolü, eylemin başlatılması ve izlenmesi gibi işlevlerin yanı sıra, baskın tepkilerin engellenmesi gibi işlevler için genel bir terim olarak açıklanmıştır(Miyake ve Friedman, 2012).

Yürütücü işlevlerinprefrontal sisteme bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu teori, otizimli bireylerde frontal lob kusuru olan nöropsikiyatrik hastalarla benzer şekilde frontal lob yetmezliği olduğunu ileri sürmüştür. Bu tür klinik bozukluklar arasında DEHB, obsesif kompulsif bozukluk, Tourette sendromu, fenilketonüri ve şizofreni yer almaktadır(Hill ve Frith, 2003).

### **Aşırı Erkek Beyni**

Aşırı Erkek Beyni Teorisi; empati ve sistematizasyon becerisine odaklanmıştır. Otistik bireylerin daha “erkeksi” bir beyin tipine (empatide zorluklar ve sistematizasyonda

beceriklilik) sahip olduklarını öne sürmüştür (Baron-Cohen ve ark., 2011). Bu teorinin, neden kadınlara göre iki ila üç kat daha fazla erkeğin otistik olarak teşhis edildiğini açıklayabileceğidüşünölmüştür (Halladay ve ark., 2015). Son zamanlarda, aşırı erkek beyni teorisi bazı nörolojik bulgular ile de desteklenmiştir(Baron-Cohen ve ark., 2005).Erkeklerde kadınlardan daha küçük olan beyin bölgelerinde (örneğin, anteriorsingulat, superiortemporalgirus , prefrontalkorteks vetalamus), otizmli kişilerin beyin bölgeleri tipik erkeklerden daha da küçük olarak bulunmuştur. Bunun tersine, erkeklerde ortalama olarak kadınlara göre daha büyük olan beyin bölgeleri (örneğin, amigdala , beyincik, genel beyin boyutu / ağırlığı ve baş çevresi), otizmli olan bireylerde normal gelişen erkeklerden daha büyük olarak bulunmuştur. Bu konuda daha fazla incelemeye ihtiyaç duyulmaktadır (Baron-Cohen, 2010).

#### **2.1.4. Eşlik Eden Psikiyatrik Durumlar**

OSB'li kişilerin yaklaşık%70'inin en az bir komorbid psikiyatrik bozukluğa sahip olduğu, yaklaşık%40'ında ise iki veya daha fazla psikiyatrik bozukluk olduğu tahmin edilmektedir (Defilippis, 2018). Araştırmalar, OSB'deki psikiyatrik eş tanının, adaptif yanıtlardaki zorlukları artırdığını, günlük aktiviteleri etkilediğini, yaşam kalitesini düşürdüğünü ve huzursuzluk, pasiflik, sosyal izolasyon, saldırganlık, sinirlilik veya kendine zarar verme gibi sorunları artırdığını göstermiştir (Erickson ve ark, 2016).

#### **Anksiyete bozuklukları**

Yapılan çalışmalara göre OSB popülasyonunda anksiyete bozukluğu prevalansının %1.47 ve %54 arasında değiştiği düşünülmektedir(Hossain ve ark., 2020).Anksiyete bozuklukları içinde de en sık özgül fobi görölmüştür. Otizmli çocuklarda IQ düzeyi 70'in altında olduğunda anksiyete ve zeka arasında korelasyon saptanmamış, ancak IQ 70'in üzerinde olduğunda zeka ile anksiyete bozukluğu arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (van Steensel ve ark., 2011).

#### **Depresif bozukluklar**

OSB'li bireyler arasında depresif bozuklukların prevalansı, % 2.5 ile%47.1 arasında bildirilmiştir (Hossain ve ark., 2020).Bu bozukluğun belirtileri, IQ seviyesi ve sözel beceriye bağlıdır.IQ düzeyi yüksek olan ve sözel becerisi gelişmiş olanlar, depresif duygudurumu tanımlayabileceği sözel becerisi olmayanlarda, ağlama krizleri, sosyal çekilme uyku

bozukluğu, önceden kazanılan işlevlerde bozulma olarak ortaya çıkabileceği bilinmektedir(Stewart ve ark, 2006).

### **Bipolar ve duygudurum bozuklukları**

Yapılan bir çalışmada OSB'li bir popülasyonda bipolar bozuklukların yaygınlığının %6-%21,4 arasında değiştiği belirtilmiştir(Hossain ve ark., 2020). Yüksek işlevli otizmlilerde OSB nin bazı belirtilerininmaniile karışabileceği bilinmektedir.Örneğin patlayıcı veya uzun uzadıya giden tek düze konuşmaların manideki logoreyle karışabileceği,eğer duygudurumdadeğişiklik ve ailede bipolarite öyküsü varsa bu olgularda BP tanısı göz önünde bulundurulması gerektiği önerilmektedir(Mukaddes, 2017).

### **Şizofreni spektrumu ve diğer psikotik bozukluklar**

Şizofreni spektrumu ve diğer psikotik bozuklukların OSB'lipopulasyondakiprevalansı, %4 ile%67 arasında değişmektedir (Hossain ve ark., 2020). Klinikte özellikle erken yaşta başlayan şizofreni ve OSB'nin birbirine karışabileceği bilinmektedir. OSB'li bireylerde olan kendi kendine konuşma,dezorganize konuşma,garip davranışlar psikotik bir süreç gibi algılanabilir. OSB'li bireylerde her zamankinden daha künt olma durumu, halüsinasyonlar, hezeyanlar meydana gelirse şizofreni spektrumu açısından değerlendirilmesi önerilmektedir(Mukaddes, 2017).

### **Obsesif-kompulsif ve ilgili bozukluklar**

OSB'de %9 ile%22 arasında değişen oranda obsesif-kompulsif ve ilişkili bozuklukların (OKB) birlikte görüldüğü saptanmıştır(Hossain ve ark., 2020).Yapılan bir çalışmada OSB'li gençlerin beklenenden daha az OKB tanısı aldığı gösterilmiş,bu bulgu, muhtemelen OSB ile ilişkili problemlerin OKB semptomlarını gölgede bırakması nedeniyle, OKB'nin eksik teşhis edildiğini düşündürmektedir (A. F. Martin ve ark., 2020). Otizmlili bireylerin klinik özellikleri incelendiğinde obsesyon daha az,kompulsiyon daha fazla gözlenmiştir.OKB tanısınınOSB'li bireylerde tekrarlayıcı davranışlarda kalitatif bir değişiklik ve kantitatif bir artma olduğunda düşünülmesi gerektiği ifade edilmiştir(Mukaddes, 2017).

### **Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu**

Yapılan çalışmalar otizmlili insanların %25.7 ile%65 arasında değişen oranda komorbiddikkat eksikliği / hiperaktivite bozukluğu (DEHB) tanısı aldığını bildirmiştir(Hossain ve ark., 2020). DEHB belirtilerinin varlığının OSB belirtilerini daha da şiddetlendirebileceği gösterilmiştir (Zablotsky ve ark., 2020). Yüksek işlevli OSB'li olgularda belirtilerin tipik

gelişen akranlarına benzediği ve bu olgularda tanı koymanın nispeten daha kolay olduğu, ancak sözel becerisi olmayan, gelişim geriliği eşlik eden olgularda DEHB'nin daha çok öfke ve şiddet davranışı olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir (Mukaddes, 2017).

### **Beslenme problemleri**

OSB'li çocuklarda beslenme problemlerinin % 80 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Nadon ve ark., 2011). Otizmlili çocuklardaki yeme problemlerinin bazılarının beslenme davranışlarıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Bunlardan bazıları; masadan kalkıp gitme, mızızlama, bağırma, yemeği fırlatma ya da dökme, yemek zamanı boyunca agresyon ve öfke nöbetleridir. Yeme problemlerinin bazılarının ise otizmin çekirdek belirtilerinden olan ritüellerle ilişkilendirilmiştir. Bu ritüeller; yemeğin çeşidi ve yemeğin hazırlanışı ile ilgili spesifik metodlarla ısrarla ilişkili olabilir (Matson ve Fodstad, 2009). Bir diğer etkenin ise yine OSB de yaygın görülen duyuusal hipo veya hipersensitivite olabileceği ifade edilmiştir. Duyusal hassasiyeti olan bir çocuk, ağızına belli kıvamdaki yiyeceklerin dokunmasından rahatsız olabilir ve bu sebeple belli gıdaları reddedebilir. Buna karşı bazı OSB'li çocuklar da aksine, ağızlarını aşırı uyararak için her şeyi ağızlarına götürebilirler (Cermak ve ark., 2010). 2020 yılında yapılan başka bir araştırmada; OSB'li çocuklarda besin seçiciliği oranı %84 olarak ortaya konulmuş, bunu %78.7 ile besin reddi, %76.5 ile hızlı yeme, %60.3 ile çiğneme problemleri, %49.3 ile yiyecek aşırma ve %19.1 ile kusma takip etmiştir (Leader ve ark., 2020).

### **Uyku problemleri**

Araştırmalar, otistik bireylerin çoğunun, kronik uyku problemi yaşadıkları sonucuna varmıştır. Bu bireylerin daha çok insomnia ve / veya sirkadiyen uyku ritmi bozuklukları yaşadıkları tespit edilmiştir (Richdale ve Schreck, 2009). Uyku problemleri OSB'li bireylerdeki artan stereotipi, tekrarlayıcı davranışlar ve saldırganlıkla ilişkili bulunmuştur (Schreck ve Richdale, 2020). Otizm semptomlarına sebep olan, çoklu genetik etkilerden bazılarının uyku problemlerine de neden olabileceği bildirilmiştir (Z. Yang ve ark., 2016).

## **2.2.Mİ-RNA**

MikroRNA'lar (miRNA'lar) kısa (~ 21 nükleotid), protein kodlamayan, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen RNA molekülleridir (L. Wu ve ark., 2012). miRNA genlerinin birincil transkriptleri olan pri-miRNA'lar, saç tokası benzeri miRNA öncüsünden oluşan uzun

RNA transkriptleridir. Pri-miRNA'lar, ribonükleaz Droscha tarafından çekirdekte pre-miRNA'lara işlenir ve exportin-5 tarafından çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmik RNase III enzimi, miRNA'yı saç tokası gövde bölgesinden ayırır. Olgun miRNA, özellikle mRNA'nın 3' bölgesi ile eşleşerek translasyonu düzenler (Ying ve ark., 2008).

MiRNA'lar genellikle belirli dokularla ilgili hastalıklarla ilişkilidir. İnsan doku biyopsilerinde, farklı organların miRNA'larının ekspresyon profilinin çıkarılması ile miRNA'ların yaklaşık %17'sinin ağırlıklı olarak belirli dokularda eksprese edildiği gösterilmiştir.

MiRNA'lar serum, plazma, tükürük, idrar, anne sütü, seminal plazma, gözyaşları, amniyotik sıvı, kolostrum, beyin omurilik sıvısı ve periton sıvısı gibi hücre dışı vücut sıvılarında tespit edilmiştir. (Kreth ve ark., 2018). Hücreler arası iletişim amacıyla hücre dışına salgılanabilmektedir. MiRNA'larmRNA'lardan daha karardır. Plazmada proteinlere, HDL'ye bağı halde veya ekzozomlar içinde taşınarak RNAaz'ların parçalamasından korunmaktadır (Hammond, 2015). miRNA'lar; hastalıkların tanısında, primeri bilinmeyen kanserleri tanımlamada, progresyonu belirlemede, tedaviye yanıt veya ilaç direncini öngörmede kullanılabilir (Hanna ve ark., 2019). Hastalığa özgü yüksek duyarlılık ve özgüllükte miRNA panellerinin geliştirilmesi mümkün görünmektedir. MiRNA'ların tedavi olarak kullanımı mümkündür. Mi-RNA düzeyinin artmasıyla oluşan hastalıklar için oligonükleotid inhibitörü kullanmak, mi-RNA düzeyinin azalmasının hastalık patogenezinde sorumlu olduğu hastalıklar için ise miRNA yerine koyma tedavisi uygulanabilir.

MiRNA'lar gelişim, hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon, hücre göçü ve apoptozis gibi işlevleri regüle etmektedir (Huleihel vd., 2014). Kanser, nörolojik hastalıklar, fibrotik hastalıklar ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalık patogenezinde veya progresyonunda fonksiyon göstermektedir (Souma vd., 2018).

İnsanlarda mi-RNA larınüçte ikisinin merkezi sinir sisteminde eksprese edildiği tespit edilmiştir (Tonacci ve ark., 2019). MiRNA'ların, çoğunlukla akson gelişimi, nöron proliferasyonu, dendrit gelişimi ve sinaptogenezinde rol alan çok sayıda hedef proteini etkiledikleri için psikiyatrik bozukluk patogenezinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (Geaghan ve ark., 2015). Örneğin şizofreni, duygudurum bozuklukları gibi psikiyatrik hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalıkta miRNA'ların ekspresyon seviyeleri değişmiş olarak saptanmıştır (Geaghan ve ark., 2015). OSB hastalarının beyin, tükürük, kan ve koku

alma hücrelerinde ekspresyonu farklılaşmış birçok miRNA tespit edilmiştir (Hicks ve Middleton, 2016).

### **2.2.1.mi-RNA-125b**

MiR-125b-5p orijinal olarak tümör baskılayan miRNA olarak tanımlanmıştır. Daha sonrakiaştırmalar miR-125b-5p'nin hücre proliferasyonu, apoptoz ve ekstraselüermatriks düzenlenmesindeki önemli rolünü ortaya çıkarmıştır (Jie ve ark., 2020).

miR-125b'nin nöronalproliferasyon, plastisite, nöron büyümesi vb. gibi önemli bir rol oynadığı düşünülen nöral hücre adezyon molekülünün (NCAM) ekspresyonunu doğrudan düzenleyebileceği ve bu mekanizma ile demans etiyojisinde yer alabileceği gösterilmiştir (L. Zhang ve ark., 2019).Mi-RNAların doğrudan veya dolaylı olarak inflamatuvar yanıtı düzenleyebileceği bilinmektedir.Astım ve alerjik riniti olan hastalarda miR-125b'nin farklı eksprese edildiği bulunmuştur (Panganiban ve ark., 2016).Frajil-x sendromu için oluşturulan bir fare modeli çalışmasında hipokampal nöronlarda miR-125b'nin aşırı ekspresyonu gözlenmiş,bu artışın sinaptik iletimde bir azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (Edbauer ve ark., 2010).

Tükürük mi-RNAlarınınOSB'li ve normal gelişim gösteren çocuklarda karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-125b'nin anlamlı olarak daha az eksprese edildiği saptanmıştır(Levitskiy ve ark., 2021).

### **2.2.2.mi-RNA-125a**

MiR-125a-5p, LIN4 mikroRNA ailesinin bir üyesidir(Russo ve Potenza, 2019). MiR-125a genomik dizisi, kromozom 19'a aittir (Lorenzetti ve ark., 2014).MiR-125a ailesinin LIN28'in ekspresyonunu azaltarak hücre farklılaşmasında / gelişiminde temel bir rol oynadığı gösterilmiştir(Aloiave ark., 2010). miR-125a-5p'nin kan-beyin bariyeri mikrovaskülerendotel hücrelerinde eksprese edildiği,(Shen ve Ma, 2020), kan-beyin bariyerinin işlevlerini geliştirdiği, sıkı birleşim proteinlerinin (Zonulin, Occludin), hücre adezyon proteinlerinin (VE-cadherin) ekspresyonlarının artırılması ve endotelial hücrelerin apoptozunun azaltılması yoluyla kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin azalmasında rol oynadığı gösterilmiştir (J. Wang ve ark., 2020).Bunun yanı sıra OSB patogenezinde rol oynadığı düşünülenneuregulin 1'in (Nrg1) miR125a-3p'nin bir hedefi olduğu tahmin edilmiştir (Yin ve ark., 2015).

Sinaps ilişkili bir protein olan nöral hücre adezyon molekülü 2 (Cadm2), nöronların gelişmesinde, nörit uzamasının düzenlenmesinde kritik role sahip bir hücre adezyon faktörüdür. Cadm2 ekspresyonundaki değişikliklerin insanlarda sinir büyümesi bozukluklarına neden olduğu öne sürülmüştür. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada miR-125a'nın Cadm2'yi hedeflediği gösterilmiştir (L. Liu ve ark., 2017).

Merkezi sinir sisteminde, oligodendrositler, aksonları çevreleyen ve sinir uyarılarının iletimini sağlayan miyelini üreten özelleşmiş glial hücrelerdir. Oligodendrosit sinyalleri, fizyolojik miyelinizasyon için gereklidir. miR-125a-3p'nin oligodendrosit gelişiminin farklı yönlerini modüle ettiği, hücre farklılaşması, miyelinsasyon ve dismiyelinsasyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Marangon ve ark., 2021).

HSPG (heparan sülfat proteoglikanlar)'nin hücre göçü, adezyon, embriyonik morfogenez, anjiyogenez, metastaz, inflamasyon, nörit büyümesi, doku onarımı vb. gibi çok sayıda biyolojik süreçte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu ailede yer alan Glipikan-4'ün, ekspresyon düzeyinin, miR-125a tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (Feng ve ark., 2012).

Artmış plazma miR-125a seviyeleri yakın zamanda bipolar bozukluğu olan hastalarda ve özellikle bipolar manik hastalarda gösterilmiştir (Camkurt ve ark., 2020). Yakın zamanda yapılan, frajil-x sendromlu hastalarla kontrollerin idrarlarındaki miRNA düzeylerini araştıran bir çalışmada, miR-125a'nın frajil-x sendromlu bireylerin idrarlarında anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır (Putkonen ve ark., 2020).

miR-125a, yakın tarihte yayınlanan tükürük mi-RNA'larının otizm, gelişimsel gecikmesi olan ve nörotipik bireylerden oluşan gruplar arasında karşılaştırıldığı çalışmada ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2020).

### **2.2.3. mi-RNA-146a-5p**

MiR-146a, Taganov ve ark. tarafından 2006 da tanımlanmış olup, kromozom 5 üzerinde lokalize olduğu tespit edilmiştir (Taganov ve ark., 2006) (Iacona ve Lutz, 2019). Çeşitli materyaller kullanılarak yapılan çalışmalarda, miR-146a aşırı ekspresyonun, dendritik dallanmayı değiştirdiği,

AMP A reseptör endositozunu indüklediği, Syt1 ve Nlgn1 ekspresyonunu inhibe

ederek, astrosit farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca frontal korteks, amigdala

ve hipokampus gibi yüksek bilişsel ve sosyal işlevler için önemli olan bölgelerde eksprese edildiği gösterilmiştir(Nguyen ve ark., 2018a).

Hamilelik sırasında maternal sigara içiminin, kötü fetalsonuçlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Sigara dumanına maruz kalan plasentalardamiR-146a'nın ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca nikotine maruz bırakılan hücrelerde miR-146a'nın ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.İkinci trimesterdaki hava kirliliği maruziyeti ile doğumda plasental miR-146a ekspresyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, miR-146a ekspresyonu ile ters ilişki bulunmuştur (Tsamou ve ark., 2018).Sodyum arsenit ve kadmiyum klorüre maruz kalmanın, miR-146a üzerinden belirgin epigenetik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir(Mumtaz ve ark., 2020).Bu sonuçlar, miR-146a'nın özellikle çevresel maruziyetlere duyarlı olduğunu ve sigara içmenin miRNA ifadesinin değiştirerek olumsuz sonuçlara yol açtığını düşündürmüştür.

Rett sendromu, Mecp2'yi kodlayan gendeki mutasyonlarla ilişkilendirilen karmaşık bir nörolojik bozukluktur. Rett sendromu fare modelinde, Mecp2 yokluğunun neden olduğu olası miRNA yanlış düzenlemesini inceleyen bir çalışmada, miR-146a nın anlamlı olarak arttığı ve bu artışın rett sendromunun belirtilerinden sorumlu olduğu düşünülmüştür(Urdinguio ve ark., 2010).Fare modelinde yapılan başka bir çalışmada miR-146a nın dirençli epilepside rol oynadığı,mirna 146a genini susturmanın patolojik değişiklikleri hafiflettiği gösterilmiştir (H.-L. Zhang ve ark., 2018).

Majör depresif bozukluğu olan hastaların monositlerindeki mirna146a ekspresyon düzeylerini kontrollerle karşılaştıran bir çalışmada; MDB olan hastalarının monositlerindemiR-146a belirgin oranda daha düşük bulunmuştur, ve bir aylık farmakoterapi ile belirgin oranda seviyelerinin yükseldiği gösterilmiş,ayrıca mirna 146a düzeyinin depresyon şiddeti ile ters orantılı olduğu saptanmıştır (Hung ve ark., 2019).

Olfaktormukozal kök hücreleri materyal olarak kullanarak,OSB'li bireyleri kontrollerle karşılaştıran bir çalışmada miR-146a'nın ekspresyonunun iki kat arttığı gösterilmiştir(Nguyen ve ark., 2016).Postmortem beyin dokularında miR-146a seviyesini otizm ve kontrol grubunda karşılaştıran bir çalışmada, miR-146a ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur(Nguyen ve ark., 2018).OSB'li hastalarla kontrolleri karşılaştıran lenfoblastoid hücre kültüründe yapılan çalışmada; miR-146a'nın belirgin olarak daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir(Talebizadeh ve ark., 2008).

#### 2.2.4. mi-RNA-106a-5p

MiR-106a-363 kümesinin, farelerde ve insanlarda X kromozomu üzerinde bulunduğu bilinmektedir(Khuvve ark.,2016)miR-106a'nın hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerinde etkileri olduğu ve bunu stres kaynaklı translasyon susturma sürecini modüle eden FASTK yolağını inhibe ederek yaptığı düşünülmektedir(Zhi ve ark., 2013). MiR-106a'nın doğuştan gelen enflamatuar tepkileri ve adaptif bağışıklık tepkilerini Toll benzeri reseptörleri (TLR) aktive ederekdüzenleyebildiği gösterilmiştir(Kimura ve ark., 2008).Ayrıca miR-106a'nınmezenkimal kök hücrelerin,nöral farklılaşması aşamasındanörogenin-2 (Ngn2)'nin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir.(H. Wang ve ark., 2017)

Psikiyatri alanında yapılan çalışmalar incelendiğinde sağlıklı kontrollere göre,bipolar bozukluğu olan hastalarda plazmadaki 106a-5p ekspresyon seviyeleri daha fazla bulunmuştur (Camkurt vd., 2020).OSB'de yapılanpostmortem beyin çalışmasında otizmlı bireylerin beyin dokusunda, otizmlı olmayan bireylere göre106a-5p daha düşük tespit edilmiştir (Abu-Elneel ve ark., 2008)Yine OSB' de yapılanaday gen belirleme çalışmasında miR-106a-5p'nin otizmle ilgili olan genleri en fazla hedeflediği gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2018). OSB'li, gelişim geriliği olan ve normal gelişim gösteren çocuklar arasında tükürük örneği ile yapılan bir çalışmada miR-106a-5p nin önemli bir farklılık göstermediği ancak ADOS kısıtlı/tekrarlayıcı davranışlar alt ölçeği ile pozitif yönde korele olduğu gösterilmiştir(Hicks ve ark., 2020).

#### 2.2.5. mi-RNA-23a-3p

miR-23a'nın, insan genomunun 19. kromozomu üzerinde bulunan ve miR-23a-27a-24-2 kümesine ait, kodlamayan bir RNA olduğu bilinmektedir(Kurkewich ve ark., 2017). MicroRNA-23a-3p'nin kanser,inflamasyonve bilişsel bozukluk gibi çeşitli hastalık süreçlerini modüle ettiği gösterilmiştir.miR-23a,'nin ekspresyonunun artmasının, nöron apoptozunudüzenlediği ve nöroinflamasyonuinhibe ettiği, buna karşılık miR-23a'nın ekspresyonunun azalmasının ters bir sonuca sahip olduğunu gösterilmiştir(Li ve ark., 2020).Ayrıca miR-23a'nın nöropatik ağrıyı doğrudan CXCR4'ü hedefleyerek düzenlediği(Pan ve ark., 2018);sıkı bağlantı proteini ZO-1'i inhibe ederek vasküler geçirgenliği ve kanser hücrelerinintransendotelial göçünü artırdığı tespit edilmiştir(Hsu ve ark., 2017).

Musashi1'in, nöral hücre kaderini kontrol eden bir RNA bağlayıcı protein olduğu, özellikle erken nöral farklılaşma için ekspresyonunun azalmasının gerekli olduğu bilinmektedir. Nöral progenitörlerden, farklılaşmış astrositlere geçiş sırasında microRNA ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada; miR-23a'nın ekspresyonunun artmasının, Musashi1 ekspresyonunu sınırlayarak, nöral progenitör proliferasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Gioia ve ark., 2014).

Otizmlili hastalarla kontrollerin lenfoblastlarındaki miR-23a düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, OSB olan hastalarda ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (Atwan ve ark., 2020). MiR-23a daha önce postmortem beyin çalışmasında otizmlili bireylerin beyin dokusunda otizmlili olmayan bireylere göre daha düşük tespit edilmiştir (Abu-Elneel ve ark., 2008). Yapılan başka bir ölüm sonrası beyin araştırmasında miR-23a'nın ekspresyon düzeylerinin OSB'de arttığı bildirilmiştir (Y. E. Wu ve ark., 2016). OSB'li olan çocukları ve olmayan kardeşlerini kıyaslayan ve lenfoblastoid hücre kültüründe yapılan araştırmada, miR-23a'nın anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (Sarachana ve ark., 2010). Okul çocuğu yaş grubunda tükürük materyali ile yapılan bir çalışmada, miR-23a'nın anlamlı olarak düşük eksprese edildiği gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2016). Bosna Hersek'te okul öncesi yaş grubunda yapılan OSB'li bireylerle kontrolleri karşılaştıran, tükürük materyalinde yapılan çalışmada miR-23a'nın anlamlı olarak düşük eksprese edildiği gösterilmiştir (Sehovic ve ark., 2020).

### **2.2.6. mi-RNA-28-3p**

miR-28-3p'nin, kanserle ilgili çeşitli genleri hedeflediği, hücre proliferasyonunu ve göçünü düzenlediği bilinmektedir (Zhao ve ark., 2020). MiRNA'ların retina progenitör hücrelerinin (RPC'ler) farklılaşmasında benzersiz roller oynadığı, CRX genini kontrol ederek, MGDP (Müller Gliadan Üretilmiş Progenitör) farklılaşmasına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada miR-28'in inhibisyonunun MGDP'lerde, Rhodopsin ve CRX ekspresyonunu artırarak fotoreseptörlerin maturasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Ji ve ark., 2017).

2020 yılında yapılan Alzheimer hastaları ile normal kontrolleri karşılaştıran bir çalışmada hasta grubunun serumunda, miR-28-3p düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Hastaların bilişsel bozukluğunun miR-28-3p ekspresyonunun artması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Zhao ve ark., 2020).

Yakın tarihli OSB'li, gelişim gecikmesi olan ve normal kontrollerden oluşan geniş örneklemlerle bir çalışmada 14 miRNA'nın tükürük düzeylerinin, kontrollerden farklılaştığı, en önemli farkın miRNA 28-3p için olduğu bulunmuştur(Hicks ve ark., 2020)

### **2.2.7. mi-RNA-151a-3p**

Mi-RNA-151a-3p'nin , kromozom 8q bölgesinde kodlandığı bilinmektedir(H. Liu ve ark., 2019). Yapılan araştırmalarda miR-151a'nın; nöral hücre proliferasyonu, farklılaşması, ve akson rehberliğinde rol oynayan CHL1 (Close Homolog of L1)'i düzenlediği gösterilmiştir(Maness ve Schachner, 2007)(Oved ve ark., 2017).

CHL1 ekspresyonu baskılanan farelerde, koku duyusu akson projeksiyonlarının yanlış yönlendiği gösterilmiştir (M. Montag-Sallaz ve Buonviso, 2002). CHL1 eksikliği olan farelerde tat uyarımının tanıdık mı yabancı mı olduğunu algılama ile ilgili defisitler geliştiği gösterilmiştir (Monique Montag-Sallaz ve Montag, 2003). Ayrıca, CHL1 fonksiyonu devre dışı bırakılan farelerde, limbik sistemden serebral kortekse doğru yanlış yönlendirilmiş nöron devreleri meydana geldiği gösterilmiştir(Demyanenko ve ark., 2004). Ayrıca miR-151a-3p'nin; kulağa gelişiminde, kulakta duyu epitelinin farklılaşmasında rolü olan ve işitme bozuklukları için yeni bir tedavi hedefi olan NOTCH sinyal yolağını kontrol ettiği gösterilmiştir(Maass ve ark., 2016)(Y. Zhang ve ark., 2021).

2014 yılında mi-RNA ve otizm alanında yapılan ilk çalışmada, miR-151a-3p'in sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak az eksprese edildiği gösterilmiştir (Mundalil Vasu ve ark., 2014) Tükürük mi-RNalarının OSB'li ve normal gelişim gösteren çocuklarda karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-151a-3p anlamlı olarak daha az eksprese edilmiştir ve ADOS toplam puanları ile korelasyon göstermiştir(Hicks ve ark., 2018)

Literatür incelendiğinde çeşitli mi-RNA'ların OSB ile ilişkisi gösterilmiş olmakla birlikte hangi mekanizma ile etkili olup hangi belirtiler ile ilişkili olduğu anlaşılamamıştır. Aynı zamanda toplumda OSB açısından, en yüksek risk taşıyan otizmliler bireylerin kardeşlerinin, mi RNAlar açısından nasıl bir profil sergilediği ve otistik özellikler ile ilişki gösterip göstermediği bilinmemektedir. Biz bu çalışmada literatürde en tutarlı değişiklik gösteren mi-RNaları seçtik ve bunların OSB vakalarında kardeşlerinden ve sağlıklı kontrollerden farklı olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca OSB'li vakaların kardeşlerindeki mi RNA düzeylerinin otistik özellikler üzerine etkisinin olup olmadığını araştırdık.

## 2.3. ÇALIŞMANIN HİPOTEZLERİ

1- Otizm Spektrum Bozukluğu olan çocukların dolaşımlarındaki miRNA (miRNA106a, miRNA 151a-3p, miRNA 125b-2p, miRNA 28-3p, miRNA125a, miRNA 23a-3p, 146a-5p) seviyeleri kardeşlerinden ve sağlıklı kontrollerden farklıdır.

2-OSB'li bireylerin dolaşımlarındaki miRNA seviyeleri otizm şiddeti ile ilişkilidir.

3- OSB'li bireylerin dolaşımlarındaki miRNA seviyeleri, davranış problemleriyle ilişkilidir.

4-OSB'li bireylerin kardeşlerinin dolaşımlarındaki miRNA seviyeleri, otistik özelliklerle ilişkilidir.

## 3. YÖNTEM VE ARAÇLAR

### 3.1. ÖRNEKLEM

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi (NEÜ) Meram Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Polikliniğine başvurup değerlendirilen, DSM-5 tanı kriterlerine göre otizm spektrum bozukluğu tanısı konulan 18-60 ay arası 35 çocuk ve kardeşi ile hasta grubu oluşturulmuştur.

Kontrol grubu olarak Meram Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bölümüne başvuran 18-60 ay arası olup OSB, zihinsel, bedensel gelişim geriliği ve belirgin kardiyolojik problemi bulunmayan 30 çocuk, ebeveynlerinin çalışmaya katılmayı kabul etmesi üzerine çalışmaya dahil edilmiştir. Katılımcılar için belirlenen çalışmaya dahil edilme ve dışlama kriterleri aşağıda yer almaktadır:

#### **Çalışma Grubu 1 Dahil Edilme Kriterleri:**

1. 18-60 ay aralığında olması,
2. Ruhsal Bozuklukların Tanısal Elkitabı, Beşinci Baskı (DSM-5) tanı kriterlerine göre Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı almış olması,
3. Hastanın anne ya da baba ile görüşmeye gelmiş olması,
4. Ebeveynden çalışmaya katılım için sözlü ve yazılı onam alınmış olması,

#### **Çalışma Grubu 1 Dışlama Kriterleri**

1. Kronik bir bedensel, metabolik, genetik, respiratuar veya nörolojik hastalık hastalığının olması (Ör: Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, Epilepsi, Serebral Palsi vb.),
2. Şiddetli kafa travması ya da organik beyin hasarının olması

### **Çalışma Grubu 2 Dahil Edilme Kriterleri (OSB'li çocukların kardeşleri)**

1. 18-60 ay aralığında olması,
2. Ruhsal Bozuklukların Tanısal Elkitabı, Beşinci Baskı (DSM-5) tanı kriterlerine göre Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı almış olan bireyin kardeşi olması
3. Hastanın anne ya da baba ile görüşmeye gelmiş olması,
4. Ebeveynden çalışmaya katılım için sözlü ve yazılı onam alınmış olması,

### **Çalışma Grubu 2 Dışlama Kriterleri**

1. Şiddetli kafa travması ya da organik beyin hasarının olması
2. OSB tanısı olması
3. Kronik bir bedensel, metabolik, genetik, respiratuar veya nörolojik hastalık hastalığının olması (Ör: Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, Epilepsi, Serebral Palsi vb.),

### **Kontrol Grubu Dahil Edilme Kriterleri**

1. 18-60 ay aralığında olması,
2. Ebeveyn ile görüşmeye gelmiş olması,
3. Ebeveynden çalışmaya katılım için sözlü ve yazılı onam alınması,

### **Kontrol Grubu Dışlama Kriterleri**

1. Kronik bir bedensel, metabolik, genetik, respiratuar veya nörolojik hastalık hastalığının olması, (Ör: Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, Epilepsi, Serebral Palsi vb.)
2. Şiddetli kafa travması ya da organik beyin hasarının olması,
3. Kendisinde, anne, baba ya da kardeşlerinden herhangi birisinde OSB olması.

## **3.2.YÖNTEM**

NEÜ Meram Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Polikliniğine başvuran DSM-5 tanı kriterlerine göre OSB tanısı konulan 18-60 ay arası çocuklar değerlendirilmiştir. Çocukların muayeneleri sırasında klinisyen tarafından OSB grubuna, Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği ve Otizm Davranış Kontrol Listesi uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak Meram Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bölümüne başvuran 18-60 ay arası olup OSB, zihinsel, bedensel gelişim geriliği ve belirgin kardiyolojik problemi bulunmayan, çalışmaya katılmayı kabul eden ebeveynlerin çocukları çalışmaya alınmıştır. Çalışma için dahil edilme ölçütlerini karşılayan olguların ailelerine çalışma ile ilgili bilgi verilerek, gönüllü olan ailelerinden imzalı onam formu alınmıştır. Muayeneyi takiben klinisyen tarafından hasta ile ilgili sosyodemografik veri formu doldurulmuştur.

Çalışmaya katılan hasta grubundaki, çocukların anne veya babaları OSB'li çocukları için, Sorunlu Davranışlar Kontrol Listesini; kardeşleri için 6-18 Yaş Aralığındaki Çocuklarda Otizm Spektrum Tarama Ölçeğinin doldurmuşlardır.

Hasta, kardeş ve kontrol grubunu oluşturan çocuklardan venöz kan numuneleri saat, açlık tokluk gibi değişkenler dikkate alınmadan alınmıştır.

### **3.3. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI**

#### **3.3.1. Sosyodemografik veri formu**

Araştırmacılar tarafından geliştirilen form aracılığı ile çocuğun yaşı, cinsiyeti, kardeş sayısı, aile yapısı, ekonomik durum gibi sosyodemografik özellikler ve ailede psikiyatrik hastalık gibi klinik özellikler belirlenmiştir.

#### **3.3.2. Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ)**

Schopler ve arkadaşlarının 1971 yılında geliştirdiği bu ölçek otizm şüphesi olan iki yaşından büyük çocukların değerlendirilmesinde ve otistik çocukların diğer gelişimsel bozukluğu olan çocuklardan ayırt edilmesinde kullanılır. Ölçek puanlaması, klinisyen tarafından gözlemlene ve aileden alınan bilgilere göre yapılır. Ölçek her biri birer alt ölçek görünümünde olan 15 maddeden (İnsanlarla ilişki, Taklit, Duygusal tepkiler, Beden

kullanımı, Nesne kullanımı, Değişikliğe uyum, Görsel tepki, Dinleme tepkisi, Tatma dokunma ve koklama tepkisi, Sözel iletişim, Sözel olmayan iletişim, Etkinlik düzeyi, Zihinsel tepki düzeyi, Genel izlenimler) oluşur ve her madde 1 ile 4 arasında yarım derecelik (1;1,5;2;2,5;3;3,5;4) puanlama ile puanlanır. Ülkemizde geçerlilik ve güvenilirliği Gassaloğlu ve ark. tarafından yapılmıştır. Ölçeğin toplam puanının Cronbach alfa değeri 0,95 olarak bulunmuştur. Ölçeğin kesme puanı 29,5 olarak belirlenmiştir.(Gassaloğlu ve ark., 2015)

### **3.3.3. Otizm Davranış Kontrol Listesi (ABC)**

Otizm Davranış Kontrol Listesi, ilk olarak okul çağı çocuklarında otistik belirtilerin şiddetini ve sıklığını tanımlamak için kullanılmıştır (Krug ve ark., 1980); ancak küçük çocuklarda da yararlı olduğu gösterilmiştir. Otizm Davranış Listesi, 57 maddeden oluşup 5 alt ölçeği (duyusal, ilişki kurma, beden ve nesne kullanımı, dil becerileri, sosyal ve öz bakım becerileri) bulunmaktadır. Otizm davranış kontrol listesinin geçerlilik ve güvenilirliği 2007 yılında İrmak ve ark. tarafından yapılmıştır. (İrmak ve ark., 2007)

### **3.3.4. Sorunlu Davranışlar Kontrol Listesi (SDKL)**

SDKL’de 5 grup altında toplanan 58 madde bulunmaktadır. Her madde 0: problem değil, 3: ağır derecede problem olmak üzere dördümlü derecelendirme ile puanlanmıştır. Toplam puan, 0 ile 124 arasında değişmektedir. Kontrol listesi zihinsel engelli bireylerle çalışan öğretmenler, uzmanlar ya da anne babalar tarafından doldurulabilmektedir (Sucuoğlu, 2003).

### **3.3.5. 6-18 Yaş Aralığındaki Çocuklarda Otizm Spektrum Tarama Ölçeği**

Otizm Spektrum Tarama Ölçeği (OSTÖ): İsveç’te geliştirilmiş 27 maddelik bir ankettir (Ehlers ve Gillberg, 1993) 10 dakika içinde tamamlanabilen 3 puanlı likert tipi bir skaladır: “Hayır” (0 puan=normal), “Biraz” (1 puan= biraz anormallik/olağandışı) ve ya “Evet” (2 puan=kesin anormallik/olağandışı). Toplam OSTÖ puanları 0 ile 54 arasındadır. Klinik ortamda otizm spektrumunda olan işlevselliği yüksek çocukları saptamak için kesim puanları öğretmenler için 22, ebeveynler için 19 olarak önerilmiştir (Ehlers ve ark., 1999) OSTÖ sosyal etkileşim (11 madde), iletişim problemleri (6 madde), kısıtlı ve

tekrarlayıcı davranışlar (5 madde) , motor sakarlık ve tikleri içeren diğer ilişkili belirtiler (5 madde) olmak üzere 4 faktörü ölçmek üzere dizayn edilmiştir(Ehlers vd., 1999). 6-18 Yaş Aralığındaki Çocuklarda Otizm Spektrum Tarama Ölçeği'ninpsikometrik özelliklerinin değerlendirilmesi Köse ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılmıştır(Köse ve ark., 2017).

#### **4. ETİK**

Araştırma uygulanmasına başlanmadan önce Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.09.2020 tarihve 2020-2824 sayılı karar ile onay alınmıştır. Araştırmaya dahil edilen katılımcılara ve ebeveynlerine araştırma ile ilgili ayrıntılı bilgilendirme yapılmış ve yazılı onam formları alınmıştır. Çalışmada kullanılan miRNA-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miRNA-151a-3p, miRNA-125a, miRNA 28-3p kitleri için maddi destek Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 201518027 numaralı proje kapsamında sağlanmıştır.

#### **5.UYGULAMA**

NEÜ Meram Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Polikliniğine başvuran DSM-5 tanı kriterlerine göre OSB tanısı konulan 18-60 ay arası olan ve aynı yaş aralığında kardeşi bulunan çocuklar çalışmaya davet edilmiştir.Çalışma için dahil edilme ölçütlerini karşılayan olguların ailelerine çalışma ile ilgili bilgi verilerek, gönüllü olan ailelerinden imzalı onam formu alınmıştır.Psikiyatrik muayeneyi takiben klinisyen tarafından hasta ile ilgili sosyodemografik veri formu doldurulmuştur.OSB grubunaklinisyen tarafından, Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği ve Otizm Davranış Kontrol Listesi uygulanmıştır.Çocukların anne veya babaları OSB'li çocukları için, Sorunlu Davranışlar Kontrol Listesini; kardeşleri için 6-18 Yaş Aralığındaki Çocuklarda Otizm Spektrum Tarama Ölçeğini doldurmuşlardır. Ardından venöz kan numunesi alınmıştır.

Kontrol grubu olarak Meram Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bölümüne başvuran 18-60 ay arası olup OSB, zihinsel, bedensel gelişim geriliği ve belirgin kardiyolojik problemi bulunmayan, çalışmaya katılmayı kabul eden ebeveynlerin çocukları çalışmaya alınmıştır. Çalışma için dahil edilme ölçütlerini karşılayan olguların ailelerine çalışma ile

İlgili bilgi verilerek, gönüllü olan ailelerinden imzalı onam formu alınmıştır. Muayeneyi takiben klinisyen tarafından hasta ile ilgili sosyodemografik veri formu doldurulmuştur. Ardından venöz kan numunesi alınmıştır.

Hasta, kardeş ve kontrol grubunu oluşturan çocuklardan venöz kan numuneleri EDTA'lı tüplerle saat, açlık, tokluk gibi değişkenlere dikkat edilmeksizin alınmıştır. Kan alınan tüp 30 dakika oda sıcaklığında, karıştırılmadan, dokunulmadan dik olarak bekletilmiştir. Numuneler santrifüj edilerek plazma kısımları ayrıştırılmıştır ve analize kadar -80°C de saklanmıştır. miRNA-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miRNA-151a-3p, miRNA-125a, miRNA 28-3p ve kontrol miRNA'sı olmak üzere 8 adet miRNA'nın ekspresyon düzeyi qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir.

## **5.1. EKSPRESYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **5.1.1 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR, RT-qPCR)**

PCR, replikasyona benzer adımlarla, DNA parçalarının primerler kullanılarak sentezlenmesi tekniğidir. PCR tekniği çift zincirli DNA'nın denatürasyonu, bölgeye spesifik primerlerin bağlanması ve zincir uzaması aşamalarını içerir. Elde edilen DNA dizileri logaritmik olarak çoğaltılır. Gerçek zamanlı PCR, PCR süreci boyunca veri toplama tekniğidir, böylece amplifikasyon ve saptamayı tek bir adımda birleştirir. Reaksiyonlar, hedef amplifikasyonun ilk tespit edildiği zaman noktası (veya PCR döngüsü) ile karakterize edilir (ct) (Wong & Medrano, 2005). Bu değer genellikle döngü eşiği olarak adlandırılır. Hızlı, duyarlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir; bu nedenle ekspresyon analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

### **5.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar**

- Santrifüj
- Real Time PCR (LightCycler® 96)
- Roche LightCycler 96 Multiwell Plate
- Etüv
- Mikrosantrifüj
- Vorteks karıştırıcı

- (DNase&RNasefree) ddH<sub>2</sub>O
- 96-100% Etanol
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml, 2.0 ml)
- Mikropipet seti ve steril filtreli mikropipet uçları
- Spin Kolonlar
- Toplama Tüpleri
- ElüsyonTüpleri
- totalmiRNA izolasyon kiti
  - mirnaextractor
  - kloroform
  - RPE solüsyon
  - RNA enzimleri içermeyen su
  - etanol
- AppliedBiologicalMaterials (abm) cDNA izolasyon kiti
  - RNA
  - 2X miRNACdnasentezsuprmix
  - Enzim mix
  - Nükleaz içermeyen sıvı
- BrightGreenmiRNAqPCRmastermix
- Abm U6 Referans Gen Primerleri
- Hedef miRNAPrimerleri

## 5.2.UYGULAMA ADIMLARI

### 5.2.1. Plazma Eldesi

1. Kan örneği düz veya EDTA'lı tüpe alındıktan sonra 5-10 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı.
2. Kan örneklerinin 2 saat içerisinde plazma ayırımı yapıldı.
3. Tüpler 2.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkartıldı ve yavaşça kapakları açıldı. Plazmanın üst kısmından 200µl'lik pipetlerle (Nükleaz

içermeyen, filtreli pipet uçları kullanılarak) 5 kez pipetleme yapıldı. Toplamda 1000 µl örnek temiz eppendorflara toplanmış oldu.

5. Toplanan 1.000 µl'lik bu plazma örneği 2.000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmanın üst kısmından (en üstte bir miktar zor görülen lipid birikir ona değmeden) 250 µl'lik kısım steril bir eppendorf tüpe alındı.
6. Ayrılmış olan plazma örnekleri çalışma yapılacağı güne kadar -80 ° C'de saklandı.



**Resim1:Santrifüj cihazı**

### **5.2.2.miRNA İzolasyonu**

1. Örnekler miRNAExtractor ile oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.
2. 0.2 ml kloroform eklenerek 30 saniye vortekslendi. 4 ° C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlendi.
3. 540 µl süpernatant, 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 180 µl %100 etanol eklendi ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetlenerek karıştırıldı.
4. Çözelti Spin kolon santrifüjüne aktarıldı. 12.000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi. Yeni bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. %100 etanolden 460 µl eklendi ve pipetlenerek birkaç kez karıştırıldı. Çözelti Spin kolona aktarıldı ve 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Spin kolonuna 0.5 ml RPE çözeltisi ilave edildi, 30 saniye boyunca 12.000 x g'de santrifüjlendi.
7. Tekrar 30 saniye boyunca 12.000 x g'de santrifüjlendi.

8. Spin kolon yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne koyuldu, 30-50 nükleaz içermeyen sıvı eklendi. 2 dakika bekletildi. 12.000 x g 30 saniye santrifüjlendi, -80 ° C de elüte edilmiş RNA çözeltisi saklandı.

### 5.2.3.miRNA'lardan cDNA Eldesi

1. Elde edilen miRNA'lar dan abmcDNA izolasyon kiti kullanılarak cdna elde edildi.
2. Kitin içeriğinde yer alan tüm birleşenler her bir örnek için Tablo1'de belirtilen miktarlarda hazırlandı. Son hacim 20 µl olacak şekilde kitin çalışma protokolüne uygun olarak çalışıldı.
3. Yapılan bu işlemlerin ardından ısı protokolü tablo 2 de belirtilen şekilde LightCycler cihazında uygulandı.

**Tablo 1.cdna mix içeriği**

RNA	5µl
2X miRNACdnasentezsuprmix	10µl
Enzim mix	2µl
Nükleaz içermeyen sıvı	3 µl

**Tablo 2.cdna için gereken süre**

37° C	30 dakika
50° C	15 dakika
85° C	5 dakika



**Resim 2: Termal Cyler**

#### **5.2.4. Real Time PCR**

1. cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla BrightGreen Master Mix ve U6 PCR PrimerMix'leri üretici firmanın tavsiyelerine uyularak tablo 5'de belirtilen hacimlere göre hazırlandı.

**Tablo 3. BrightGreen Mastermix ve U6 primer mastermix içeriği**

BrightGreen Master Mix	10µl
MirnaforwardPrimer 300 nM	1µl
Mirna reverse primer 300 nM	1 µl
cDNA 250 ng	5 µl
H2O	3µl
Total Volume	20 µl

2. Hazırlanan referans gen real time PCR mix'leri ve hedef gen real time PCR mix'leri, uygun cDNA'lar ile LightCycler 96 sistemine ait 96 kuyucuklu plakalar üzerinde biraraya getirildikten sonra tablo 6' da belirtilen ısı protokolü uygulanarak Light Cycler96 sisteminde real time PCR işlemine alındı.

**Tablo 4. Real time PCR ısı protokolü**

<b>Denaturasyon</b>	95°C de 10 dk.
<b>Amplifikasyon</b> Bu döngü 40 kez sağlanır.	95°C de 10 sn. 60°C de 15sn 72 °C de 30sn Okuma
<b>Erime eğrisi</b>	95°C de 30 sn. 50 °C de 1 dk. 90 °C de continue(Acquisitions 3 per/°C)
<b>Soğutma</b>	40 °C de 1 dk.

3. MikroRNA'lar için eşik değeri geçen floresan sinyaller ile Ct değerleri belirlendi.  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri hesaplandı. İstatiksel analiz için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri kullanıldı.



**Resim 3: Real Time PCR Cihazı**

## 6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 paket programı kullanıldı. Demografik bulgular betimsel analiz yöntemleri ile incelendi, frekans (n) ve yüzde (%) değerleri verildi. Sayısal verilerin dağılımı; Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri farkı Kruskal Wallis testi ile analiz edildi. Anlamli farklılık gösteren miRNA lar Post hoc analizle ikili gruplar arasında karşılaştırıldı. miRNA'lar

arasındaki ilişki ve miRNA düzeylerinin ölçeklerle ilişkisi Spearman'srho korelasyon analizi kullanılarak test edildi. İlgili miRNA'ların hastalık tanısında etkisini yordamak için multinominal lojistik regresyon analizi yapıldı. (p) değeri için 0,05'ten küçük veriler istatistiksel anlamlılık olarak belirlendi.

## 7.BULGULAR

### 7.1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri

Çalışma grupları, hasta grubu, kardeş grubu ve kontrol grubu olarak oluşturuldu. Hasta grubu 35, kardeş grubu 35,kontrol grubu 30 kişiydi.Katılımcıların yaşları 18 ay ile 60 ay arasında olup kontrol grubunda  $36.67 \pm 9,6$ ; kardeş grubunda  $37.06 \pm 15.4$  otizm grubunda  $40.94 \pm 12,5$ ay olup gruplar arasında farklılık göstermemiştir.( $p=0,309$ ) (Tablo6) Çalışma grubunun cinsiyet dağılımı %68 (n=68) erkek, %32 (n=32) kadından oluşmaktaydı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi.( $p=0,009$ ) (Tablo 5)

**Tablo 5. Cinsiyet dağılımı**

		Kontrol	Kardeş	Otizm	KWH	p
Cinsiyet	Erkek N	23	17	28	9,329	0,009
	Kadın N	7	18	7		
Total N		30	35	35		

**Kruskal Wallis Test  $p<0.05$**

**Tablo 6. Grupların Yaş Dağılımı**

Grup		N	Ort.	SS	KWH	p
Kontrol	Yaş	30	36,67	9,600	2.351	0,309
Kardeş	Yaş	35	37,06	15,456		
Otizm	Yaş	35	40,94	12,530		

**Kruskal Wallis Test  $p<0.05$**

## 7.2. Grupların MikroRNA Düzeyleri ve Otizm Grubunun Ölçek Puanları

**Tablo 7. Grupların Mikro RNA Düzeyleri ve Otizm Grubunun Ölçek Puanları**

Grup		N	Minimum	Maximum	Ortalama	SS
Kontrol	Yaş	30	18	59	36,67	9,600
	MİR106a 2-ΔΔCt	30	,0658429	650,395026	45,32456510	146,889291609
	MİR151 2-ΔΔCt	30	,0035569	623,751507	37,21962074	122,060014862
	MİR125b 2-ΔΔCt	30	,0002231	3326,217207	122,01668141	606,572432139
	MİR28 2-ΔΔCt	30	,0445016	436,5490646	31,047817859	106,201445697
	MİR125a 2-ΔΔCt	30	,0130422	647,7679746	25,820921917	117,691527843
	MİR23a 2-ΔΔCt	30	,0005852	422,0619677	15,297020052	76,9750086819
	MİR146a 2-ΔΔCt	29	,0066120	548,4857561	27,174129408	102,867735443
Kardeş	Yaş	35	18	60	37,06	15,456
	MİR106a 2-ΔΔCt	35	,1203387	164,8685505	11,333440992	30,7847611397
	MİR151 2-ΔΔCt	35	,0071138	40,6399743	4,175477399	10,2044431563
	MİR125b 2-ΔΔCt	35	,0143746	412,9051683	16,596860762	69,9296592054
	MİR28 2-ΔΔCt	35	,0371627	221,3215312	12,697119957	39,5617986452
	MİR125 2-ΔΔCt	35	,0144713	270,4716051	18,004755955	57,9423024711
	MİR23a 2-ΔΔCt	35	,0007255	10,7876673	,530269099	1,8628446726
	MİR146a 2-ΔΔCt	33	,0098840	103,9186184	6,606651969	20,9888213926
Otizm	OSTÖ	32	0	19	5.19	5.208
	Yaş	35	18	60	40,94	12,530
	MİR106a 2-ΔΔCt	35	,2803250	482,7633731	18,299998921	81,0166638867
	MİR151 2-ΔΔCt	35	,0198437	27,1866708	1,562971952	4,7274151750
	MİR125b 2-ΔΔCt	35	,0693321	56,4799406	4,303121715	9,7390470582
	MİR28 2-ΔΔCt	35	,0994421	47,8351760	6,741146554	9,4843464442
	MİR125a 2-ΔΔCt	35	,0660331	17,3797248	1,642966861	2,9485397964
	MİR23A 2-ΔΔCt	35	0,0000000	1,1339138	,093460228	,1952255596
	MİR146a 2-ΔΔCt	31	,0029590	57,2542286	4,214916644	10,9608751389
	CARS	35	23,5	41,5	31,229	4,5991
	ABC Duyusal Alt Ölçek	35	0	17	5,51	5,393
	ABC İlişki Kurma Alt Ölçek	35	0	26	8,97	7,733
	ABC Beden ve Nesne Kullanımı Alt Ölçek	35	0	35	9,17	7,687
	ABC Dil Becerileri Alt Ölçek	35	0	27	8,83	5,938
	ABC Sosyal ve Öz bakım Alt Ölçek	35	0	17	9,06	4,614
	SDKL Toplam Puan	34	5,00	106,00	34,9412	26,32425

### 7.3. Gruplarının Mi RNA düzeylerinin karşılaştırılması

Çalışma grupları, hasta grubu 35 kişi, kardeş grubu 35 kişi ve kontrol grubu 30 kişi olarak oluşturulmuştur. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri farkı Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark gösterdiği saptanan mi-RNAlar için post hoc analizler yapılmıştır. Buna göre yapılan Kruskal Wallis analizinde miR-106a-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (p=0.030), miR-151a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (p=0.036) ve miR-28  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (p=0.005) değerlerinin gruplar arasında anlamlı fark gösterdiği saptanmıştır. (Tablo 8) Yapılan post hoc analizde ise miR-106a-5p'nin otizm grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha az eksprese edildiği (p=0.024), diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermediği; miR-151a'nın otizm grubunda kontrol grubuna göre daha az eksprese edildiği (p=0.048), diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermediği; miR-28'in otizm grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az eksprese edildiği (p=0.008); ayrıca otizm grubunda kardeş grubundan da anlamlı olarak daha az eksprese edildiği gösterilmiştir (p=0,042) diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermediği saptanmıştır.

**Tablo 8. Grupların mi-RNA düzeylerinin karşılaştırılması**

mi-RNA	Kontrol 1	Kardeş 2	Otizm 3	KWH	p	Post hoc
MİR106a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	45,32457	11,33344	18,3	7,042	0.030	1>3
MİR151 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	37,21962	37,21962	1,562972	6,628	0.036	1>3
MİR125b $2^{-\Delta\Delta Ct}$	122,0167	16,59686	4,303122	3,783	0.151	
MİR28 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	31,04782	12,69712	6,741147	10,463	0.005	1>3, 2>3
MİR125a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	25,82092	18,00476	1,642967	0,775	0.679	
MİR23a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	15,29702	0,530269	0,09346	5,705	0.058	
MİR146a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	27,17413	6,606652	4,214917	3,253	0.197	

**Kruskal Wallis Test ve Post hoc analiz p<0.05**

**Tablo 9. MİR106a 2-ΔΔCt değerleri için Post hoc analiz**

Grup-grup	Test statistic	StdError	Std.Teststatistic	P	AdjSig
<b>Kontrol-kardeş</b>	-9.488	7,218	-1,314	0.189	0.566
<b>Kontrol-otizm</b>	-19.131	7.218	-2.650	0.008	0.024
<b>Kardeş-otizm</b>	-9.643	6,935	-1.390	0,493	0.493

**Post hoc analiz p<0.05**

**Tablo 10. MİR151a 2-ΔΔCt değerleri için Post hoc analiz**

Grup-grup	Test statistic	StdError	Std.Teststatistic	P	AdjSig
<b>Kontrol-kardeş</b>	2.457	6,935	0.354	0.723	1
<b>Kontrol-otizm</b>	17.371	7.218	2,407	0.016	0.048
<b>Kardeş-otizm</b>	14,914	7.218	2.066	0,039	0.116

**Post hoc analiz p<0.05**

**Tablo 11. MİR28 2-ΔΔCt değerleri için Post hoc analiz**

Grup-grup	Test statistic	StdError	Std.Teststatistic	P	AdjSig
<b>Kontrol-kardeş</b>	-4.681	7,218	-0,649	0.517	1
<b>Kontrol-otizm</b>	-21,795	7.218	-3,020	0.003	0.008
<b>Kardeş-otizm</b>	-17.114	6,935	-2.468	0,014	0.041

**Post hoc analiz p<0.05**

## 7.4 MikroRNA Düzeylerinin ve Ölçek Puanlarının Korelasyon Analizi

Ölçekler ile miRNA'ların ve miRNA'ların diğer miRNA'lar ile ilişkisi Spearman korelasyon analizi ile incelendi.

**Tablo 12. Mi RNA ların birbirleri ile ve ölçeklerle olan korelasyonu**

		MİR106 a2-ΔΔCt	MİR151 2-ΔΔCt	MİR125 b2-ΔΔCt	MİR282- ΔΔCt	MİR125 a2-ΔΔCt	MİR23a 2-ΔΔCt	MİR146 a2-ΔΔCt	CARS	ABC Duyusal Alt Ölçek	ABC İlişki Kurma Alt Ölçek	ABC Beden ve Nesne Kullanım Alt Ölçek	ABC DİL Beceriler Alt Ölçek	ABC Sosyal ve Özbakım Alt Ölçek	SDKL
MİR106a2-ΔΔCt	r														
	p														
MİR1512-ΔΔCt	r	,280													
	p	,104													
MİR125b2-ΔΔCt	r	,454**	,295												
	p	,006	,085												
MİR282-ΔΔCt	r	,190	,268	,472**											
	p	,274	,120	,004											
MİR125a2-ΔΔCt	r	,051	-,111	-,122	,171										
	p	,772	,526	,485	,326										
MİR23a2-ΔΔCt	r	,053	,269	,500**	,426*	-,228									
	p	,764	,118	,002	,011	,189									
MİR146a2-ΔΔCt	r	,279	,220	,383*	,504**	-,135	,137								
	p	,128	,235	,033	,004	,467	,462								
CARS Toplam Puan	r	,034	,126	,050	-,004	,080	,125	-,328							
	p	,848	,470	,773	,980	,647	,476	,072							
ABC Duyusal Alt Ölçek	r	-,209	,217	-,050	,081	-,173	,396*	-,135	,535**						
	p	,228	,210	,774	,646	,320	,018	,470	,001						
ABC İlişki Kurma Alt Ölçek	r	-,107	,189	,198	,056	-,124	,291	-,063	,656**	,681**					
	p	,541	,277	,254	,750	,479	,089	,738	,000	,000					
ABC Beden ve Nesne Kullanımı Alt Ölçek	r	-,060	-,006	-,167	,090	-,053	,034	-,063	,720**	,547**	,532**				
	p	,733	,971	,338	,606	,765	,845	,736	,000	,001	,001				
ABC Dil Becerileri Alt Ölçek	r	,054	,103	-,019	,212	-,086	,327	-,138	,547**	,633**	,449**	,650**			
	p	,757	,555	,913	,222	,625	,056	,459	,001	,000	,007	,000			
ABC Sosyal ve Özbakım Alt Ölçek	r	-,099	-,066	-,104	-,066	-,075	,125	-,098	,738**	,603**	,704**	,715**	,657**		
	p	,570	,707	,552	,707	,669	,473	,598	,000	,000	,000	,000	,000		
Sorun Davranış Kontrol Listesi Toplam Puan	r	-,081	-,003	-,195	,063	,299	-,022	-,290	,576**	,428*	,333	,492**	,410*	,473**	
	p	,650	,988	,269	,721	,086	,901	,121	,000	,012	,054	,003	,016	,005	

Spearman korelasyon \*\*p<0,01, \*p<0,05

**Tablo13. Kardeş grubunun mi-RNA düzeylerinin Otizm Spektrum Tarama Ölçeği ile korelasyonu**

		OSTÖ	MIR106A 2- ΔΔCt	MIR151 2- ΔΔCt	MIR125b 2- ΔΔCt	MIR28 2- ΔΔCt	MIR125a 2- ΔΔCt	MIR23a 2- ΔΔCt	MIR146a 2- ΔΔCt
OSTÖ	r								
	p								
MIR106a 2-ΔΔCt	r	-,100							
	p	,574							
MIR151 2-ΔΔCt	r	-,102	,553**						
	p	,568	,001						
MIR125b 2-ΔΔCt	r	-,185	,663**	,506**					
	p	,296	,000	,002					
MIR28 2-ΔΔCt	r	-,149	,689**	,522**	,657**				
	p	,402	,000	,001	,000				
MIR125a 2-ΔΔCt	r	-,225	,579**	,390*	,264	,352*			
	p	,200	,000	,020	,126	,038			
MIR23a 2-ΔΔCt	r	-,143	,384*	,511**	,289	,452**	,291		
	p	,419	,023	,002	,092	,006	,090		
MIR146a 2-ΔΔCt	r	-,392*	,363*	,376*	,253	,499**	,256	,528**	
	p	,026	,038	,031	,155	,003	,151	,002	

Spearman korelasyon \*\*p<0,01, \*p<0,05

Yapılan Spearman korelasyon analizleri sonucunda; miR-28 2<sup>-ΔΔCt</sup> değeri ile CARS' ın 11 numaralı maddesi "Sözel İletişim" arasında pozitif yönde (p=0.035); ABC ölçeğinin 32. maddesi "Cümleleri defalarca tekrarlar" (p=0.023) ve 48. maddesi "Başkalarının cümlelerini yada sorularını tekrarlar" (p=0.03) ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır.miR-23a 2<sup>-ΔΔCt</sup> değeri ile Otizm Davranış Kontrol Listesi Duyusal alt ölçeği ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır.(p=0.018).miR-146a 2<sup>-ΔΔCt</sup> değeri ile otizm spektrum tarama ölçeği ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır.(0,026).miR-151 2<sup>-ΔΔCt</sup> değeri ile CARS' ın 8 numaralı maddesi "Dinleme tepkisi" arasında pozitif yönde(p=0.011);ABC ölçeğinin 39. maddesi "Bir çok sese kulaklarını kapatır" ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır (p=0.026).

**Tablo14. Otizm grubunda anlamlı bulunan mi-RNA düzeylerinin CARS ölçeğinin alt maddeleri ile korelasyonu**

		MIR106a 2- ΔΔCt	MIR28 2- ΔΔCt	MIR151a 2- ΔΔCt	MIR23a 2- ΔΔCt	CARS1	CARS2	CARS3	CARS4	CARS5	CARS6	CARS7	CARS8	CARS9	CARS10	CARS11	CARS12	CARS13	CARS14	CARS15	
MIR106a 2- ΔΔCt	r																				
	p																				
MIR28 2- ΔΔCt	r	,649**																			
	p	,000																			
MIR151a 2- ΔΔCt	r	,440**	,402**																		
	p	,000	,000																		
MIR23a 2- ΔΔCt	r	,242*	,329**	,366**																	
	p	,015	,001	,000																	
CARS1	r	-,024	-,041	,238	,319																
	p	,889	,813	,168	,062																
CARS2	r	,309	-,026	-,026	-,151	,135															
	p	,071	,884	,880	,386	,441															
CARS3	r	-,221	-,251	-,111	-,056	,127	-,038														
	p	,202	,147	,524	,750	,466	,829														
CARS4	r	-,101	-,011	,094	-,021	-,014	,387*	,216													
	p	,563	,950	,590	,905	,936	,022	,212													
CARS5	r	,057	-,105	,033	-,153	,229	,490**	,564**	,394*												
	p	,743	,548	,850	,381	,185	,003	,000	,019												
CARS6	r	,120	-,192	,117	-,130	,061	,216	,348*	,461**	,436**											
	p	,493	,269	,503	,457	,727	,213	,040	,005	,009											
CARS7	r	-,038	-,049	,061	-,070	,292	,277	,328	,320	,606**	,279										
	p	,829	,780	,728	,690	,088	,107	,054	,061	,000	,104										
CARS8	r	,098	,323	,426*	,181	,376*	,088	,116	,056	,101	,116	,205									
	p	,577	,058	,011	,299	,026	,614	,507	,747	,563	,507	,237									
CARS9	r	-,046	-,096	-,002	-,098	,324	,020	,384*	,244	,489**	,405*	,638**	,184								
	p	,793	,584	,993	,574	,058	,911	,023	,158	,003	,016	,000	,289								
CARS10	r	,028	,157	,258	,393*	,409*	,015	,238	-,007	,308	,090	,292	,316	,403*							
	p	,873	,369	,134	,019	,015	,934	,169	,969	,072	,606	,089	,064	,017							
CARS11	r	,126	,357*	,111	,177	,053	,141	,185	,087	,178	-,029	,364*	,200	,189	,439**						
	p	,471	,035	,525	,309	,762	,420	,288	,618	,305	,870	,032	,248	,276	,008						
CARS12	r	,280	-,051	,322	,291	,344*	,149	,129	,169	,256	-,052	,373*	,149	,278	,395*	,258					
	p	,103	,772	,059	,089	,043	,392	,460	,331	,138	,767	,027	,394	,106	,019	,134					
CARS13	r	,227	,221	-,160	,219	,022	-,131	,169	-,258	,045	-,116	,140	,050	,334	,363*	,473**	,235				
	p	,189	,202	,357	,206	,899	,455	,331	,134	,799	,508	,421	,774	,050	,032	,004	,174				
CARS14	r	,117	-,315	,160	-,139	,373*	,064	,311	,252	,359*	,542**	,328	,155	,473**	,034	-,070	,236	,180			
	p	,504	,066	,359	,427	,027	,717	,069	,144	,034	,001	,055	,375	,004	,846	,689	,172	,301			
CARS15	r	,051	,066	,054	,207	,603**	,486**	,189	,238	,346*	,056	,403*	,480**	,352*	,453**	,302	,452**	,190	,204		
	p	,770	,707	,759	,234	,000	,003	,277	,168	,042	,751	,016	,004	,038	,006	,078	,006	,274	,240		

Spearman korelasyonu \*\*p<0,01, \*p<0,05

## 7.5. Multinomial Lojistik Regresyon Analizi

miRNA'ların hasta ve kontrol grubunu yordama gücü lojistik regresyon analizi ile test edildi. Cinsiyet, yaş, vemi-RNA ların hasta, kardeş, kontrol gruplarını tahmin etme olasılıkları multinomial lojistik regresyon analizi ile test edildi. Kruskal Wallis analizinde gruplar arasında anlamlı fark gösteren mi-RNA lar anlamlı fark göstermediler.

**Tablo 15. miR- 106a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,568	,870	,427	,514	
	Yaş	,010	,021	,211	,646	1,010
	Cinsiyet	1,227	,562	4,760	,029	3,411
	MİR106a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,004	,004	,851	,356	,996
Otizm	Intercept	-,723	,857	,712	,399	
	Yaş	,025	,020	1,542	,214	1,025
	Cinsiyet	-,135	,619	,048	,827	,874
	MİR106a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,002	,003	,780	,377	,998

**Referans kategorisi: Kontrol grubu**

**Tablo 16. miR- 125b, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	P	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,597	,866	,475	,491	
	Yaş	,008	,021	,155	,693	1,008
	Cinsiyet	1,405	,576	5,961	,015	4,076
	MİR125b 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,001	,001	,875	,350	,999
Otizm	Intercept	-,623	,862	,522	,470	
	Yaş	,023	,020	1,286	,257	1,023
	Cinsiyet	-,009	,634	,000	,988	,991
	MİR125b 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,012	,014	,751	,386	,988

**Referans kategorisi: Kontrol grubu**

**Tablo 17.miR- 151a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,454	,884	,264	,608	
	Yaş	,008	,021	,141	,708	1,008
	Cinsiyet	1,329	,581	5,233	,022	3,776
	MİR151 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,016	,013	1,340	,247	,985
Otizm	Intercept	-,363	,884	,169	,681	
	Yaş	,021	,021	1,062	,303	1,022
	Cinsiyet	-,109	,643	,029	,866	,897
	MİR151 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,066	,042	2,450	,118	,936

**Referans kategorisi: Kontrol grubu****Tablo 18.miR- 28, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,522	,882	,350	,554	
	Yaş	,007	,021	,124	,725	1,007
	Cinsiyet	1,303	,565	5,328	,021	3,681
	MİR28 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,004	,004	,831	,362	,997
Otizm	Intercept	-,572	,871	,431	,512	
	Yaş	,022	,020	1,148	,284	1,022
	Cinsiyet	-,081	,624	,017	,897	,922
	MİR28 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,008	,008	,970	,325	,992

**Referans kategorisi: Kontrol grubu****Tablo 19.miR- 125a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,721	,863	,698	,403	
	Yaş	,011	,021	,296	,587	1,011
	Cinsiyet	1,294	,561	5,324	,021	3,647
	MİR125a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,001	,003	,035	,852	,999
Otizm	Intercept	-,590	,866	,464	,496	
	Yaş	,026	,020	1,564	,211	1,026
	Cinsiyet	-,149	,621	,058	,810	,861
	MİR125a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,065	,059	1,239	,266	,937

**Referans kategorisi: Kontrol grubu**

**Tablo 20.miR- 23a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,533	,889	,360	,548	
	Yaş	,007	,021	,120	,729	1,007
	Cinsiyet	1,418	,581	5,950	,015	4,130
	MİR23a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,056	,095	,354	,552	,945
Otizm	Intercept	-,357	,884	,163	,686	
	Yaş	,023	,021	1,265	,261	1,024
	Cinsiyet	-,116	,648	,032	,858	,890
	MİR23a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-2,007	1,200	2,796	,095	,134

**Referans kategorisi: Kontrol grubu****Tablo 21.miR- 146a, Yaş, Cinsiyet faktörlerinin modeli açıklama gücü**

Grup		B	SS	Wald	p	Exp(B)
Kardeş	Intercept	-,369	,894	,170	,680	
	Yaş	,003	,021	,023	,880	1,003
	Cinsiyet	1,476	,609	5,877	,015	4,377
	MİR146a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,008	,008	1,060	,303	,992
Otizm	Intercept	-,382	,890	,184	,668	
	Yaş	,014	,021	,444	,505	1,014
	Cinsiyet	,141	,679	,043	,835	1,152
	MİR146a 2- $\Delta\Delta$ Ct	-,014	,015	,905	,342	,986

**Referans kategorisi: Kontrol grubu**

## 8.TARTIŞMA

OSB, fenotipikolarak heterojenlikgösteren klinik spektrumdur ve etkilenen bireyler, farklı seviyelerde etkilenmeler gösterirler. Bu çalışmada çeşitli şiddetlerde OSB belirtileri gösteren okul öncesi dönem otizmlili bireylerin ve kardeşlerinin dolaşımlarındaki 7 miRNA'nın (miR-125b, miR-23a-3p, miR-146a-5p, miR-106a, miR-151a-3p, miR-125a, miRNA 28-3p) düzeyinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması ve bu miRNA düzeylerinin otizm şiddeti, davranış sorunları, otistik trait özellikler üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. OSB'nin henüz biyolojik bir belirteci yoktur ve etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır.Araştırmamız, etkilenen bireylerde meydana gelen epigenetik süreçleri anlamak için yeni perspektifler açabilir.MiR-106a-5p, miR-151a-3p, miR-28-3p düzeyleri

otizmli bireylerde kontrollere göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Ancak yapılan multinominal lojistik regresyon analizinde anlamlılık düzeyini yitirmiştir.

miR-106a-5p'nin insanlarda X kromozomu üzerinde olduğu hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (Zhi ve ark., 2013). miR-106a-5p'nin mezenkimal kök hücrelerin, nöral farklılaşması aşamasında nörogenin-2 (Ngn2) ekspresyonunu düzenleyerek rol oynadığı gösterilmiştir (H. Wang ve ark., 2017). miR-106a-5p daha önce yapılan bir postmortem beyin çalışmasında otizmli bireylerin beyin dokusunda otizmli olmayan bireylere göre daha düşük tespit edilmiştir (Abu-Elneel ve ark., 2008). 2018 yılında yapılan aday gen çalışmasında miR-106a-5p'nin otizmle ilgili olan genleri en fazla hedeflediği gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2018). OSB'li, gelişim geriliği olan ve normal gelişim gösteren çocuklar arasında tükürük örneği ile yapılan bir çalışmada miR-106a-5p'nin önemli bir farklılık göstermediği ancak ADOS kısıtlı/tekrarlayıcı davranışlar alt ölçeği ile pozitif yönde korele olduğu gösterilmiştir (Hicks ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda miR-106a-5p  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0.024$ ). Ancak yapılan multinominal lojistik regresyon analizinde anlamlılık düzeyini yitirmiştir. Bunun nedeni X kromozomu üzerinde kodlanan mi-RNA ların kadın ve erkeklerde farklı eksprese ediliyor olması ve bizim çalışma gruplarımızın bu anlamda farklılık gösteriyor olması olabilir.

miR-151a-3p'nin nöral hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması, ve talomokortikalakson rehberliğinde merkezi rol oynayan CHL1'in kodlanmasını düzenlediği bilinmektedir (Maness ve Schachner, 2007) (Wright ve ark., 2007). Ayrıca miR-151a-3p'nin koku ve işitme gelişiminde rolü olduğu, işitme duyu epitelinin farklılaşmasında işlevi olan ve işitme bozuklukları için yeni bir tedavi hedefi olan NOTCH sinyal yolağını kontrol ettiği gösterilmiştir (Maass ve ark., 2016) (Y. Zhang ve ark., 2021) (Naz ve Friedman, 2020). 2014 yılında mi-RNA ve otizm alanında yapılan ilk çalışmada, miR-151a-3p'in sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak az eksprese edildiği gösterilmiştir (Mundalil Vasu vd., 2014b). Tükürük mi-RNA larının OSB'li ve normal gelişim gösteren çocuklarda karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-151a-3p anlamlı olarak daha az eksprese edilmiştir ve ADOS toplam puanları ile korelasyon göstermiştir. Bizim çalışmamızda OSB grubunda kontrol grubuna oranla Kruskal Wallis analizinde anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır, ancak yaş ve cinsiyet unsurlarının dahil edildiği multinominal lojistik regresyon analizinde anlamlılık düzeyini yitirmiştir. Kardeş ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu durum örneklem büyüklüğünün yeterli olmamasından, ya da farklı etnik gruplarda OSB etyolojisinde farklı mi-RNA'ların ön plana

çıkmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca CARS' ın 8 numaralı maddesi "Dinleme tepkisi" arasında pozitif yönde korelasyon saptanmıştır ( $p=0.011$ ); ABC ölçeğinin 39. maddesi "Birçok sese kulaklarını kapatır" ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır ( $p=0.026$ ). Bu durum kohlea gelişiminde rol oynayan mir151a'nın otizmdeki bazı seslere gösterilen aşırı duyarlılığın veya sese karşı olan tepkisizliğin patagonezinde rol oynadığını gösterebilir, dahası hiperakuzi gibi otizmde görülen yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan semptomların tedavisinde yeni bir tedavi olanağı olabilir.

MiR-125b'nin birden fazla hedef geni inhibe ederek insan hücrelerinin nöronal farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Qiu ve ark., 2019). Tükürük mi-RNalarının OSB'li ve normal gelişim gösteren çocuklarda karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-125b anlamlı olarak daha az eksprese edilmiştir ve ADOS sosyal alt ölçek puanları ile korelasyon göstermiştir. OSB detükürük mi-RNA ları ile yapılan boylamsal bir çalışmada miR-125b nin başlangıç seviyesi ile özel eğitim müdahalesi sonrası olan seviyesinin anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır (Levitskiy ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda miR-125b değeri hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark göstermemiştir. Bu sonuçlar örneklem grubumuzun belirti şiddetinin oldukça heterojen olmasından kaynaklanıyor olabilir. miR-125b değerinin eğitsel müdahale ile nörotipik kontrollerin değerlerine yaklaşıyor olması, düzeyinin çevresel faktörlerle ve hastalık şiddetine duyarlı olduğunu gösteriyor olabilir. Çalışmamızda belirti şiddeti düşük vaka sayısının az olmamasından ve vakaların çoğunun özel eğitime devam ediyor olmasından dolayı değerler anlamlılık düzeyinin altında kalmış olabilir.

miR-28-3p'nin, kanserle ilgili çeşitli genleri hedeflediği ve hücre proliferasyonu ve göçüne katılabilen bir miRNA olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2020). Yakın tarihli OSB'li, gelişim gecikmesi olan ve normal kontrollerden oluşan geniş örneklemlili bir çalışmada 14 miRNA'nın tükürük düzeylerinin, kontrollerden farklılaştığı, en önemli farkın miRNA 28-3p için olduğu bulunmuştur (Hicks vd., 2020). Bizim çalışmamızda miR-28  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark göstermiştir ( $p=0.008$ ); hasta ve kardeş grubu arasında anlamlı fark göstermiştir ( $p=0,042$ ). Ancak demografik verilerle yapılan lojistik regresyon analizinde anlamlılık düzeyini kaybetmiştir. Çalışma gruplarını yaş, cinsiyet, etnik köken gibi ilgili faktörlere göre eşleştirmeye çalıştık. Ancak mevcut olan COVID-19 pandemisi ve gruplardan birinin kardeş grubu olması nedeniyle bu optimal düzeyde olmadı. Sonuç olarak, örnekleminiz eğitim seti, yaş ve cinsiyet gruplar arası farklılıklar göstermektedir. Ayrıca mi-RNA seviyelerinin cinsiyete göre nasıl farklılaştığı açık değildir. Bütün bunlar göz önüne alındığında dahi, miR-28-3p'nin otizm grubunda hem benzer genetiği hem de benzer çevreyi

paylaşan kardeş grubundan ve kontrol grubundan farklı ekspresyona sahip olması miR-28-3p' yi diğer mi-RNAlar arasında farklı bir noktaya getirmektedir. Aynı zamanda miR-28  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri ile CARS' ın 11 numaralı maddesi "Sözel İletişim" arasında pozitif yönde ( $p=0.035$ ); ABC ölçeğinin 32. maddesi "Cümleleri defalarca tekrarlar" ( $p=0.023$ ) ve 48. maddesi "Başkalarının cümlelerini ya da sorularını tekrarlar" maddesi ile ( $p=0.03$ ) ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. Bu verilere bakıldığında miR-28' in otizmdeki ekolali paterni ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Daha önce otizmdeki ekolalin ayna nöron sistemi disfonksiyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir(Ganos ve ark., 2012) miR-28 in ayna nöron sistemi üzerinde düzenleyici rolü olabilir. Otizmde çoğunlukla genel bir konuşma gecikmesi söz konusu olur; verbal olunduğunda ise ekolali paterni öncelikle ortaya çıkabilir, bu da mi-RNA-28 düzeyinin OSB' de düşük olmasını ve aynı zamanda ekolali paterni ile pozitif yönde korele olmasını açıklayabilir. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

miR-125a ailesinin hücre farklılaşmasında / gelişiminde temel bir rol oynadığı gösterilmiştir(Aloia ve ark., 2010). Normal gelişim sırasında erkek ve dişi frontal lob bölgesinde miR-125a'nın farklı ekspresyonu bildirilmiştir(Ziats ve Rennert, 2014)miR-125a, yakın tarihte yayınlanan tükürük mi-RNA'larının otizm, gelişimsel gecikmesi olan ve nörotipik bireylerden oluşan gruplar arasında karşılaştırıldığı çalışmada ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir(Hicks vd., 2020).Biz çalışmamızda gruplar arasında anlamlı farklılık tespit etmedik. Bunun nedeni miR-125a'nın cinsiyetler arasında farklı ekspresyona ediliyor oluşu ve bunu, çalışma sırasında heterojen dağılım nedeni ile kontrol edemeyişimiz olabilir.

miR-23a'nın türler arasında yüksek oranda korunduğu ve kanser inflamasyon, ve bilişsel bozukluk gibi çeşitli hastalık süreçlerindedüzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir. MSS hastalıklarında miR-23a'nın potansiyel bir modülatör işlevi olduğunu düşünülmektedir (Pan ve ark., 2018). Otizmlili hastalarla kontrollerin lenfoblastlarındaki miR-23a düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada OSB olan hastalarda ekspresyonun artmış olduğu gösterilmiştir(Atwan ve ark., 2020).miR-23a daha önce postmortem beyin çalışmasında otizmlili bireylerin beyin dokusunda otizmlili olmayan bireylere göre daha düşük tespit edilmiştir (Abu-Elneel vd., 2013). OSB olan bireylerle, olmayan bireylerin ölüm sonrası beyin mi-RNA araştırmasında mir-23a' nın ekspresyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir(Y. E. Wu ve ark., 2016). OSB olan ve olmayan kardeşlerini kıyaslayan ve lenfoblastoid hücre kültüründe yapılan araştırmada, miR-23a nın anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur, bu

çalışma sadece erkek bireyleri içeren örneklem grubunda yapılmıştır(Sarachana ve ark., 2010).Okul çocuğu yaş grubunda tükürük materyali ile yapılan bir çalışmada, miR-23a nın anlamlı olarak düşük eksprese edildiği gösterilmiştir(Hicks ve ark., 2016). Bosna Hersek'te okul öncesi yaş grubunda yapılan OSB'li bireylerle kontrolleri karşılaştıran,tükürük materyalinde yapılan çalışmada miR-23a nın anlamlı olarak düşük eksprese edildiği gösterilmiştir(Sehovic ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda otizm grunda en düşük ekspresyon seviyeleri kontrol grubunda en yüksek ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyine yakın bir farklılık gözlenmiştir (p=0.058) Bu daha önce cinsiyeti erkek olan kardeşlerle, erkek hastaları karşılaştıran çalışmaya zıt veriler vermiştir.Verilerimiz , miR-23a'yı düşük saptayan diğer verilerle uyum gösterme eğilimindedir. miR-23a nın inflamasyon süreçlerinde etkili olduğunu yukarıda belirtmiştik, biz çalışmamızda alerji durumunu kontrol etmedik, alerjik immünolojik hadiseler sonuçları etkileyebilir.İlerleyen araştırmalarda, bu faktörlerin kontrolleri ile daha geniş bir örneklem grubunda veriler yenilenmelidir. Aynı zamanda miR-23a ile Otizm Davranış Kontrol Listesi Duyusal alt ölçeği ile pozitif yönde korelasyon göstermiştir bu yeni bir bilgi olup, miR-23a nın otizmdeki farklılığının kompanseuar bir mekanizmayla olup olmadığını akla getirmektedir. Literatürde bununla ilgili yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

MiR-146a'nınpostnatal evrelerde, frontal korteks, amigdala ve hipokampus gibi yüksek bilişsel ve sosyal işlevler için önemli olan bölgelerde eksprese edildiği, miR-146a aşırı ekspresyonun, nöronal farklılaşmayı uyardığı; dendritik dallanmayı değiştirdiği gösterilmiştir (Nguyen vd., 2018b.) Küçük bir örneklemde yapılan olfaktormukozal kök hücreleri materyal olarak kullanarak OSB olan bireyleri kontrollerle karşılaştıran bir çalışmada miR-146a nın ekspresyonunun iki kat arttığı gösterilmiştir(Nguyen ve ark., 2016).Postmortem beyin dokularında miR-146a seviyesini otizm ve kontrol grubunda karşılaştıran bir çalışmada, miR-146a ekspresyonunun OSB'de artmış olduğu bulunmuştur(Nguyen vd., 2018b).Lenfoblastoid hücre kültüründe yapılan hasta ve kontrol grubunu karşılaştıran çalışmada; miR-146a'nın belirgin olarak daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir(Talebizadeh vd., 2008). Bizim çalışmamızda gruplar arasında anlamlığa ulaşan bir fark gözlenmemekle beraber otizm grubunda düşük olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir.Kardeş grubunda doldurulan otizm spektrum tarama ölçeği ile negatif yönde korelasyon göstermiştir. Bu literatürdeki bulgulara zıt bir bulgudur.

Çalışmamızın örneklem sayısının az olması, kesitsel bir çalışma olması, COVID 19 nedeni ile grupların cinsiyet bakımından tam eşlenememiş olması, hastaların aldığı eğitsel tedavilerin

kontrol edilmemiş olması, otizm tanısının klinik görüşmeyle konulmuş olması çalışmamızın kısıtlılıkları arasında yer almaktadır. Çalışmamızın güçlü yönleri de bulunmaktadır. Bunlar literatürde OSB olan hastaların kardeşlerini normal grupla karşılaştıran nadir çalışmalardan biri olması, OSB de araştırılmış olan mi-RNA ların otizmin çekirdek semptomları dışındaki ek problemlerle olan ilişkisini incelemesi ve bildiğimiz kadarıyla mi-RNA'ların otistik trait özelliklerle ilişkisini araştıran ilk çalışma olmasıdır.

## 9.SONUÇ VE ÖNERİLER

Biz çalışmamızda daha önce OSB'de biyobelirteç olmaya aday gösterilmiş mi RNA ların bizim örneğimizde farklılık gösterip göstermediğini, ayrıca OSB olan hastaların kardeşlerinin bu miRNAlar bakımından hastalardan ve sağlıklı kontrollerden farklılaşp farklılaşmadığını, OSB olan hastalardaki hangi semptomla daha ilişkili olduğunu ve OSB şiddetini öngörüp öngörmediğini araştırdık.

Çalışmamızda gruplar arasında anlamlılığa ulaşan mi-RNA ekspresyon farklılığı gözlenmedi. miR-23a ile Otizm Davranış Kontrol Listesinin Duyusal alt ölçeği arasında pozitif yönde korelasyon saptandı. MiR-146a ile Otizm Spektrum Tarama Ölçeği arasında pozitif yönde korelasyon saptandı. MiR-151a ile CARS' ın 8 numaralı maddesi "Dinleme tepkisi" arasında pozitif yönde, ABC ölçeğinin 39. maddesi "Birçok sese kulaklarını kapatır" ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. miR-28 ile CARS' ın 11 numaralı maddesi "Sözel İletişim" arasında pozitif yönde; ABC ölçeğinin 32. maddesi "Cümleleri defalarca tekrarlar" ve 48. maddesi "Başkalarının cümlelerini ya da sorularını tekrarlar" maddesi ile pozitif yönde korelasyon saptanmıştır.

Mi-RNA ların, OSB'deki farklı belirti kümeleri üzerinde rol oynadığını düşünmekteyiz ve gelecek araştırmalarda bu konu üzerinde çalışılması gerektiği görüşünderiz. Ayrıca çalışmaların daha geniş hastalık şiddeti gösteren gruplar üzerinde tekrarlanması gerektiği ve sadece otistik trait özellikler gösteren gruplardaki mi-RNA düzeylerinin de çalışılması gerektiği görüşünderiz. Yeni yapılacak çalışmaların, gebelikten itibaren gelen çevresel faktörlerin; (sigara ve kimyasal maruziyeti, ekonomik durum, beslenme şekli, uyaran kalitesi, alınan özel eğitim uygulama süresi ve şekli) kontrol edilmesi yoluyla, hangi mi-RNA nın hangi epigenetik mekanizma üzerinden etkili olduğu konusuna ışık tutabileceği kanaatindeyiz.

## 10. KAYNAKLAR

- Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH. Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.2003;33(1):93–97.
- Aloia L, Parisi S, Fusco L, Pastore L, Russo T. Differentiation of Embryonic Stem Cells 1 (DIES1) Is a Component of Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) Signaling Pathway Required for Proper Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*.2010;285(10):7776–7783.
- American Psychiatric Association. "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV). Washington, DC." 1994.
- American Psychiatric Association. "American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)". *American Journal of Psychiatry*; 2013.
- Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, et al. A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism. *American Journal of Human Genetics*.2008;82(1):160–164.
- Atwan H, Assarehzadegan MA, Shekarabi M, Jazayeri SM, Barfi S, Shokouhi Shoormast Ret al. Assessment of miR-181b-5p, miR-23a-3p, BCL-2, and IL-6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Autistic Patients; Likelihood of Reliable Biomarkers. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2008.
- Baron-Cohen S. Empathizing, systemizing, and the extreme male brain theory of autism.2010.p.167–175.
- Baron-Cohen S, Knickmeyer RC, Belmonte MK. Sex Differences in the Brain: Implications for Explaining Autism. *Science*.2005;310(5749): 819–823.
- Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R. Why Are Autism Spectrum Conditions More Prevalent in Males? *PLoS Biology*.2011;9(6), e1001081.
- Bergbaum A, Ogilvie CM. Autism and chromosome abnormalities-A review. *Clinical Anatomy*.2016;29(5): 620–627.
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U et al. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genetics*.2010;42(6): 489–491.
- Berko ER, Suzuki M, Beren F, Lemetre C, Alaimo CM, Calder RB et al. Mosaic Epigenetic Dysregulation of Ectodermal Cells in Autism Spectrum Disorder. *PLoS Genetics*.2014; 10(5).
- Blatt GJ, Fatemi SH. Alterations in GABAergic biomarkers in the autism brain: Research findings and clinical implications. *Anatomical Record*.2011;294(10):1646–1652.
- Blaus A, Madabushi R, Pacanowski M, Rose M, Schuck RN, Stockbridge N et al. Personalized Cardiovascular Medicine Today: A Food and Drug Administration/Center

- for Drug Evaluation and Research Perspective. *Circulation*. 2016;132(15):1425–1432.
- Bohm HV, Stewart MG, Healy AM. On the Autistic Spectrum Disorder concordance rates of twins and non-twin siblings. *Medical Hypotheses*.2013; 81(5): 789–791.
- Boucher J. Putting theory of mind in its place: Psychological explanations of the socio-emotional-communicative impairments in autistic spectrum disorder. *Autism*.2012; 16(3): 226–246.
- Camkurt MA, Karababa İF, Erdal ME, Kandemir SB, Fries GR, Bayazit H et al. MicroRNA dysregulation in manic and euthymic patients with bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*.2020;261: 84–90.
- Cermak SA, Curtin C, Bandini LG. Food Selectivity and Sensory Sensitivity in Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of the American Dietetic Association*.2010;110(2): 238–246.
- Colvert E, Tick B, McEwen F, Stewart C, Curran SR, Woodhouse E et al. Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA Psychiatry* 2015;72(5): 415–423.
- Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ. et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA - Journal of the American Medical Association*.2011;306(18): 2001–2010.
- Defilippis M. Depression in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder.. *Children*.2018
- Demyanenko GP, Schachner M, Anton E, Schmid R, Feng G, Sanes J, Maness PF. Close Homolog of L1 Modulates Area-Specific Neuronal Positioning and Dendrite Orientation in the Cerebral Cortex. *Neuron*.2004;44(3): 423–437.
- Dodds L, Fell DB, Shea S, Armson BA, Allen AC, Bryson S. The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.2011;41(7): 891–902.
- Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *Içinde Journal of Anatomy*.2017;230 (1): 4–15.
- Durkin MS, Maenner MJ, Newschaffer CJ, Lee LC, Cunniff CM, Daniels JL et al. Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *American Journal of Epidemiology* 2008;168(11): 1268–1276.
- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN et al. Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*2010; 65(3):373–384.
- Ehlers S, Gillberg C. The Epidemiology of Asperger Syndrome. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1993; 34(8):1327–1350.
- Ehlers S, Gillberg C, Wing L. A screening questionnaire for Asperger syndrome and other high-functioning autism spectrum disorders in school age children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.1999;29(2): 129–141.
- Ellis SE, Gupta S, Moes A, West AB, Arking DE. Exaggerated CpH methylation in the autism-affected brain. *Molecular Autism*.2017;8(1): 6.

- Emberti Gialloreti L, Mazzone L, Benvenuto A, Fasano A, Alcon AG, Kraneveld et al. Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. *Journal of Clinical Medicine*.2019;8(2): 217.
- Erickson C, Srivorakiat L, Wink L, Pedapati E, Fitzpatrick S. Aggression in autism spectrum disorder: presentation and treatment options. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*.2016; 1525.
- Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ et al. Consensus paper: Pathological role of the cerebellum in Autism. *Cerebellum*.2012;(11)3:. 777–807
- Feng C, Li J, Ruan J, Ding K. MicroRNA-125a inhibits cell growth by targeting glypican-4. *Glycoconjugate Journal*.2012; 29(7): 503–511.
- Fogassi L. Parietal Lobe: From Action Organization to Intention Understanding. *Science*.2005; 308(5722):662–667.
- Gallese V, Keysers C, Rizzolatti G. A unifying view of the basis of social cognition. *Trends in Cognitive Sciences*.2004;8(9): 396–403.
- Ganos C, Ogrzal T, Schnitzler A, Münchau A. The pathophysiology of echopraxia/echolalia: Relevance to Gilles De La Tourette syndrome. *Movement Disorders*.2012;27(10): 1222–1229.
- Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*.2014; 46(8):881–885.
- Geaghan M, Jairns MC. MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry. Elsevier. 2015;78(4):231-239
- Gioia U, Di Carlo V, Caramanica P, Toselli C, Cinquino A, Marchioni M. Mir-23a and mir-125b regulate neural stem/progenitor cell proliferation by targeting Musashi1. *RNA Biology*.2014;11(9): 1105–1112.
- Halladay AK, Bishop S, Constantino JN, Daniels AM, Koenig K, Palmer K. Sex and gender differences in autism spectrum disorder: Summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Molecular Autism*.2015;6(1):36.
- Hammond S. M. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*.2015; 87, 3–14.
- Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in genetics*.2019; 10: 478.
- Happé F. Autism: cognitive deficit or cognitive style? *Trends in Cognitive Sciences*.2014;3(6):216–222.
- Harada M, Taki MM, Nose A, Kubo H, Mori K, Nishitani H, Matsuda T. Non-invasive evaluation of the GABAergic/glutamatergic system in autistic patients observed by MEGA-editing proton MR spectroscopy using a clinical 3 Tesla instrument. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.2011;41(4):447–454.
- Harony H, Wagner S. The contribution of oxytocin and vasopressin to mammalian social behavior: Potential role in autism spectrum disorder. *NeuroSignals*.2011;(18)2:82–97.

- Hicks SD, Carpenter RL, Wagner KE, Pauley R, Barros M, Tierney-Aves C et al. Saliva MicroRNA Differentiates Children With Autism From Peers With Typical and Atypical Development. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2020;59(2): 296–308.
- Hicks SD, Ignacio C, Gentile K, Middleton FA. Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC Pediatrics*. 2016;16(1):1–11.
- Hicks SD, Middleton FA. A comparative review of microRNA expression patterns in autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2016;7:176.
- Hicks SD, Rajan AT, Wagner KE, Barns S, Carpenter RL, Middleton FA. Validation of a Salivary RNA Test for Childhood Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics*. 2018;9.
- Hill EL, Frith U. Understanding autism: insights from mind and brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2003;358(1430): 281–289.
- Hossain, MM, Khan N, Sultana A, Ma P, McKyer ELJ, Ahmed HU, Purohit N. Prevalence of comorbid psychiatric disorders among people with autism spectrum disorder: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Psychiatry Research*. 2020; 287
- Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan, YC, Tsai PH. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34): 4929–4942.
- Hu Y, Ehli EA, Boomsma DI. MicroRNAs as biomarkers for psychiatric disorders with a focus on autism spectrum disorder: Current progress in genetic association studies, expression profiling, and translational research. *Autism Research*. 2017;10(7):1184–
- Huleihel L, Ben-Yehudah A, Milosevic J, Yu G, Pandit K, Sakamoto K et al. Let-7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2014; 306(6): L534–L542.
- Hung YY, Wu MK, Tsai MC, Huang YL, Kang HY. Aberrant Expression of Intracellular let-7e, miR-146a, and miR-155 Correlates with Severity of Depression in Patients with Major Depressive Disorder and Is Ameliorated after Antidepressant Treatment. *Cells* 2019; 8(7).
- Iacona JR, Lutz CS. miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2019; e1533.
- Irmak T, Sütçü S, Aydın A, Sorias O. Otizm Davranış Kontrol Listesinin (ABC) geçerlik ve güvenilirliğinin incelenmesi. 2007
- Issler O, Chen, A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 2015; 16(4): 201-212.
- Ji HP, Xiong Y, Song WT, Zhang ED, Gao ZL, Yao F. MicroRNA-28 potentially regulates the photoreceptor lineage commitment of Müller glia-derived progenitors. *Scientific reports*. 2017;7(1): 11374.

- Jie J, Xu X, Li W, Wang G. Regulation of Apoptosis and Inflammatory Response in Interleukin-1 $\beta$ -Induced Nucleus Pulposus Cells by miR-125b-5p Via Targeting TRIAP1. *Biochemical Genetics*.2020;59(2), 475-490.
- İncekaş Gassaloğlu S, Baykara B, Avcil S, Demiral Y. Validity and Reliability Analysis of Turkish Version of Childhood Autism Rating Scale. *Turkish Journal of Psychiatry*. 2016; 27(4).
- Kalkbrenner AE, Schmidt RJ, Penlesky AC. Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2014;44(10): 277–318.
- Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child*, 1943;2(3): 217-250.
- Kaysılı K, Bahar B. Zihin kuramı: otizm spektrum bozukluğu olan ve normal gelişen çocukların performanslarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi Özel Eğitim Dergisi*.2013;14(1): 83–103.
- Khuu C, Uthem TP, Sehic A. The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica*. 2016.
- Kim, HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y. Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. *American Journal of Human Genetics*.2008;82(1): 199–207.
- KimYS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *American Journal of Psychiatry*.2011;168(9): 904–912.
- Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* .2008; 105 (28): 9721-9726.
- Köse S, Özbaran B, Yazgan Y, Baytunca MB, BildikT, ErermisS, Aydın C. The psychometric properties of Turkish version of Autism Spectrum Screening Questionnaire in children aged 6-18 years. *Turk Psikiyatri Dergisi*.2017; 28(4): 268–277.
- Kreth S, Hübner M, Hinske LC. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesthesia & Analgesia* .2018;126(2), 670–681.
- Kurkewich JL, Hansen J, Klopfenstein N, Zhang H, Wood C, Boucher A et al. The miR-23a~27a~24-2 microRNA cluster buffers transcription and signaling pathways during hematopoiesis. *PLoS Genetics*.2017;13(7).
- Le Couteur AL, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M et al. Autism as a strongly genetic disorder evidence from a british twin Study. *Psychological Medicine*.1995; 25(1): 63–77.
- Leader G, Tuohy E, Chen JL, Mannion A, Gilroy SP. Feeding Problems, Gastrointestinal Symptoms, Challenging Behavior and Sensory Issues in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.2020;50(4):1401–1410.
- Levitskiy D, Confair A, Wagner KE, DeVita S, Shea N, McKernan EP et al. Longitudinal stability of salivary microRNA biomarkers in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders*.2021; 85, 101788.
- Li Z, Xu R, Zhu X, Li Y, Wang Y, Xu W. MicroRNA-23a-3p improves traumatic brain injury

- through modulating the neurological apoptosis and inflammation response in mice. *Cell Cycle*.2020; 19(1): 24–38.
- Liu H, Cheng Y, Xu Y, Xu H, Lin Z, Fan J, Lan J. The inhibition of tumor protein p53 by microRNA-151a-3p induced cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Bioscience Reports*.2019;39(10).
- Liu L, Gao J, He X, Cai Y, Wang L, Fan X. Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: A meta-analysis. *Scientific Reports*.2017;7 (1): 1-8.
- Lorenzetti D, Poirier C, Zhao M, Overbeek PA, Harrison W, Bishop CE. A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mammalian Genome*.2014; 25(3–4): 141–148.
- Lotter V. Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social psychiatry*. 1966;1(3): 124–135.
- Maass JC, Gu R, Cai T, Wan YW, Cantellano SC, Asprer JST et al. Transcriptomic Analysis of Mouse Cochlear Supporting Cell Maturation Reveals Large-Scale Changes in Notch Responsiveness Prior to the Onset of Hearing. *PLoS ONE*.2016;11(12): 167286.
- Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature Neuroscience*. 2007;10(1):19–26.
- Marangon D, Abbracchio MP, Lecca D. Pathway-Focused Profiling of Oligodendrocytes Over-Expressing miR-125a-3p Reveals Alteration of Wnt and Cell-to-Cell Signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2021; 41(1): 105–114.
- Martin AF, Jassi A, Cullen AE, Broadbent M, Downs J, Krebs G. Co-occurring obsessive–compulsive disorder and autism spectrum disorder in young people: prevalence, clinical characteristics and outcomes. *European Child and Adolescent Psychiatry*.2020;29(11):1603–1611.
- Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neuroscience Bulletin*.2017;33(2):183–193. Science Press.
- Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, Fadda R et al. An overview of the main genetic, epigenetic and environmental factors involved in autism spectrum disorder focusing on synaptic activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(21): 1–22.
- Matson JL, Fodstad JC. Issues in Identifying the Etiology of Food Refusal in Young Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2009;48(3): 274–275.
- McCracken JT, McGough J, Shah B, Cronin P, Hong D, Aman MG et al. Risperidone in Children with Autism and Serious Behavioral Problems. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347(5): 314–321.
- Miyake A, Friedman NP. The Nature and Organization of Individual Differences in Executive Functions. *Current Directions in Psychological Science*. 2012;21(1): 8–14.
- Molenberghs P, Cunnington R, Mattingley JB. Is the mirror neuron system involved in

- imitation? A short review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.2009;33(7): 975–980.
- Montag-Sallaz M, Buonviso N. Altered odor-induced expression of c-fos and arg 3.1 immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. *Journal of Neurobiology*. 2002;52(1): 61–72.
- Montag-Sallaz M, Montag D. Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning and Memory*. 2003;10(2): 99–107.
- Mukaddes NM. Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı ve Takip (2. baskı).2017.
- Mukaddes NM, Ercan ES. Nörogelişimsel Bozukluklar. 2018; 263p.
- Mumtaz F, Albeltagy RS, Diab MSM, Abdel Moneim AE, El-Habit OH.Exposure to arsenite and cadmium induces organotoxicity and miRNAs deregulation in male rats. *Environmental Science and Pollution Research*.2020;27(14): 17184–17193.
- Nadon G, Feldman DE, Dunn W, Gisel E. Mealtime problems in children with Autism Spectrum Disorder and their typically developing siblings: A comparison study. *Autism*. 2011;15(1): 98–113.
- Nah YH, Young RL, Brewer N. Using the Autism Detection in Early Childhood (ADEC) and Childhood Autism Rating Scales (CARS) to predict long term outcomes in children with autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2014; 44(9): 2301–2310.
- Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M et al. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Archives of General Psychiatry*. 2010; 67(1): 59–68.
- Naz S, Friedman TB. Growth factor and receptor malfunctions associated with human genetic deafness. *Clinical genetics*. 2020; 97(1): 138–155.
- Nguyen LS, Fregeac J, Bole-Feysot C, Cagnard N, Iyer A, AninkJ et al. Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: Relevance for neurodevelopmental disorders. *Molecular Autism* 2018a; 9(1): 1–12.
- Nguyen LS, Fregeac J, Bole-Feysot C, Cagnard N, Iyer A, AninkJ et al.. Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders.*Molecular Autism*. 2018b; 9(1): 38.
- Nguyen LS, Lepleux M, Makhlof M, Martin C, Fregeac J, Siquier-Pernet K et al.Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Molecular Autism*.2016; 7(1): 1.
- Oberman LM, RamachandranVS. The simulating social mind: The role of the mirror neuron system and simulation in the social and communicative deficits of autism spectrum disorders. *Psychological Bulletin*. 2007; 133(2): 310–327.
- Oved K, Farberov L, Gilam A, Israel I, Haguel D, Gurwitz D et al. MicroRNA-Mediated Regulation of ITGB3 and CHL1 Is Implicated in SSRI Action. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017; 10.
- Palinkas LA, Mendon SJ, Hamilton AB. Innovations in Mixed Methods Evaluations. *Annual Review of Public Health*. 2019;(40): 423–442

- Pan Z, Shan Q, Gu P, Wang XM, Tai LW, Sun M et al. miRNA-23a/CXCR4 regulates neuropathic pain via directly targeting TXNIP/NLRP3 inflammasome axis. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15(1):29.
- Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137(5): 1423–1432.
- Pickles A, Bolton P, Macdonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim CH et al. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: A twin and family history study of autism. *American Journal of Human Genetics*. 1995;57(3): 717–726.
- Putkonen N, Laiho A, Ethell D, Pursiheimo J, Anttonen AK, Pitkonen J et al. Urine microRNA Profiling Displays miR-125a Dysregulation in Children with Fragile X Syndrome. *Cells*. 2020; 9(2):289.
- Qiu J, Zhu J, Zhang R, Liang W, Ma W, Zhang Q et al. miR-125b-5p targeting TRAF6 relieves skeletal muscle atrophy induced by fasting or denervation. *Annals of translational medicine*. 2019; 7(18): 456.
- Quaak I, Brouns MR, van de Bor M. The dynamics of Autism Spectrum Disorders: How neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(8):3384–3408.
- Ramachandran VS, Oberman LM. Broken mirrors: a theory of autism. *Scientific American*. 2006; 295(5): 62–69.
- Richdale AL, Schreck KA. Sleep problems in autism spectrum disorders: Prevalence, nature, & possible biopsychosocial aetiologies. *Sleep Medicine Reviews*. 2009; 13(6): 403–411.
- Rizzolatti G, Craighero L. The mirror-neuron system. *Annual Review of Neuroscience*. 2004; 27(1): 169–192.
- Russo A, Potenza N. Antiproliferative Activity of microRNA-125a and its Molecular Targets. *MicroRNA*. 2019; 8(3):173–179.
- Sarachana T, Zhou R, Chen G, Manji HK, Hu VW. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Medicine* 2010; 2(4).
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019; 234(5):5451-5465.
- Schepici G, Cavalli E, Bramanti P, Mazzone E. (2019). Review Autism Spectrum Disorder and miRNA: An Overview of Experimental Models. *Brain Sciences*, 9(10).
- Schiele MA, Domschke K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. *Genes, Brain and Behavior*. 2018;17(3).
- Schreck KA, Richdale AL. Sleep problems, behavior, and psychopathology in autism: inter-relationships across the lifespan. *Current Opinion in Psychology*. 2020; 34: 105–111.
- Schumann CM, Barnes CC, Lord C, Courchesne E. Amygdala Enlargement in Toddlers with Autism Related to Severity of Social and Communication Impairments. *Biological*

- Psychiatry.2009; 66(10): 942–949.
- Sehovic E, Spahic L, Smajlovic-Skenderagic L, Pistoljevic N, Dzanko E, Hajdarpasic A. Identification of developmental disorders including autism spectrum disorder using salivary miRNAs in children from Bosnia and Herzegovina. *Plos One*. 2020; 15(4):e0232351.
- Shamsi F, Hosseini S, Tahamtan M, Bayat M. Methodology Report: The Impaired Theory of Mind in Autism Spectrum Disorders and the Possible Remediative Role of Transcranial Direct Current Stimulation. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies*. 2019; 3(3): 175–178.
- Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah IN. Tipping the balance of autism risk: Potential mechanisms linking pesticides and Autism. *Environmental Health Perspectives* .2012; 120,(7): 944–951.
- Shen G, Ma Q. MicroRNAs in the Blood-Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Current Neuropharmacology*.2020; 18(12): 1180–1186.
- Shenoy M, Indla V, Reddy H. Comprehensive management of autism: Current evidence. *Indian Journal of Psychological Medicine*. 2017; 39(6): 727–731.
- Souma K, Shichino S, Hashimoto S, Ueha S, Tsukui, T, Nakajima T et al. Lung fibroblasts express a miR-19a-19b-20a sub-cluster to suppress TGF- $\beta$ -associated fibroblast activation in murine pulmonary fibrosis. *Scientific reports*.2018; 8(1): 16642.
- Sroufe LA. The Concept of Development in Developmental Psychopathology. *Child Development Perspectives*. 2009; 3(3): 178–183.
- Stewart ME, Barnard L, Pearson J, Hasan R, O'Brien G. Presentation of depression in autism and Asperger syndrome: A review. *Autism* .2006; 10(1):103–116). S
- Sucuoğlu, B. Sorun Davranışlar Kontrol Listesi Türkçe Formunun Psikometrik Özelliklerinin İncelenmesi. *Türk Psikoloji Dergisi*. 2003; 18(52): 77–96.
- Sun E, Shi Y. MicroRNAs: Small molecules with big roles in neurodevelopment and diseases. *Experimental Neurology* .2015; 268: 46–53.
- Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L et al. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *American Journal of Human Genetics*. 2005; 77(2): 265–279.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(33):12481–12486.
- Talebizadeh Z, Butler MG, Theodoro MF. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Research*.2008; 1(4): 240–250.
- Tartaglia NR, Wilson R, Miller JS, Rafalko J, Cordeiro L, Davis S et al. Autism Spectrum Disorder in Males with Sex Chromosome Aneuploidy: XXY/Klinefelter Syndrome, XYY, and XXYY. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*.2017; 38(3):197–207.

- Tekin-İftar, E..Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Çocuklar ve Eğitimleri (1. Baskı). 2012
- Tonacci A, Bagnato G, Pandolfo G, Billeci L, Sansone F, Conte R et al. MicroRNA Cross-Involvement in Autism Spectrum Disorders and Atopic Dermatitis: A Literature Review. *Journal of Clinical Medicine*.2019; 8(1):88.
- Tsamou M, Vrijens K, Madhloum N, Lefebvre W, Vanpoucke C, Nawrot TS. Air pollution-induced placental epigenetic alterations in early life: a candidate miRNA approach. *Epigenetics*.2018. 13(2), 135–146.
- Urduingui RG, Fernández AF, Lopez-Nieva P, Rossi S, Huertas D, Kulis M et al. Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics*. 2010; 5(7): 656–663.
- Van Steensel FJA, BögelsSM, Perrin S. Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis. *Clinical Child and Family Psychology Review*.2011; 14(3):302–317.
- Van Steensel, FJA, Heeman EJ. Anxiety Levels in Children with Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. *Journal of Child and Family Studies*. 2017; 26(7): 1753–1767.
- Volkmar FR, Cohen DJ, Paul R. An Evaluation of DSM-III Criteria for Infantile Autism. *Journal of the American Academy of Child Psychiatry*.1986; 25(2): 190–197.
- Wang H, BanW, Wang T, Li Z, Dang X. MiR-20b/106a modulate Ngn2 gene expression during neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *NeuroReport*.2017; 28(18): 1225–1231.
- Wang J, Nie Z, Zhao H, Gao K, Cao Y. MiRNA-125a-5p attenuates blood–spinal cord barrier permeability under hypoxia in vitro. *Biotechnology Letters*.2020; 42(1): 25–34.
- Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics*.2019;60(1):37–47.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*.2005; 39(1): 75–85.
- Wright AG, Demyanenko GP, Powell A, Schachner M, Enriquez-Barreto L, Tran TS et al. Close Homolog of L1 and Neuropilin 1 Mediate Guidance of Thalamocortical Axons at the Ventral Telencephalon. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27(50): 13667–13679.
- Wu L, Li H, Jia CY, ChengW, Yu M, Peng M et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Letters*. 2012; 586(7): 1038–1043.
- Wu YE, Parikshak NN, Belgard TG, Geschwind DH. Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*. 2016; 19(11):1463–1476.
- Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K et al. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain and Development*. 2016; 38(1):91–99.
- Yin F, Zhang JN, Wang SW, Zhou CH, Zhao MM, FanWH et al. MiR-125a-3p Regulates Glioma Apoptosis and Invasion by Regulating Nrg1. *Plos One*. 2015; 10(1):e0116759.
- Ying, SY, Chang DC, Lin SL. The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Molecular biotechnology*.2008; 38(3): 257-268.

- Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: Pathophysiological implications. *Acta Neuropathologica*. 2007; 113(5): 559–568.
- Zablotsky B, Bramlett MD, Blumberg SJ. The Co-Occurrence of Autism Spectrum Disorder in Children With ADHD. *Journal of Attention Disorders*. 2020; 24(1): 94–103.
- Zerbo O, Iosif AM, Walker C, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Is Maternal Influenza or Fever During Pregnancy Associated with Autism or Developmental Delays? Results from the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2013; 43(1): 25–33.
- Zhang HL, Lin YH, Qu Y, Chen Q. The effect of miR-146a gene silencing on drug-resistance and expression of protein of P-gp and MRP1 in epilepsy. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018; 22(8): 2372–2379.
- Zhang L, Dong H, Si Y, Wu N, Cao H, Mei B, Meng B. miR-125b promotes tau phosphorylation by targeting the neural cell adhesion molecule in neuropathological progression. *Neurobiology of Aging*. 2019; 73: 41–49.
- Zhang Y, Gao T, Li X, Wen CC, Yan XT, Peng C et al. Circ\_0005075 targeting miR-151a-3p promotes neuropathic pain in CCI rats via inducing NOTCH2 expression. *Gene*. 2021; 767.
- Zhao X, Wang S, Sun W. Expression of miR-28-3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020; 20(3): 2218.
- Zhi F, Zhou G, Shao N, Xia X, Shi Y, Wang Q et al. miR-106a-5p Inhibits the Proliferation and Migration of Astrocytoma Cells and Promotes Apoptosis by Targeting FASTK. *PLoS ONE*. 2013; 8(8):e72390.
- Ziats MN, Rennert OM. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Molecular Psychiatry*. 2014; 19(7): 848–852.