



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**İNFANT VE ERKEN ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE
DİRENÇLİ NÖBET, OTİSTİK BOZUKLUK VE NÖBETİN
EŞLİK ETTİĞİ OTİSTİK HASTALARDA CDKL5 GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Erdoğan

KAYSERİ-2012



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**İNFANT VE ERKEN ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE
DİRENÇLİ NÖBET, OTİSTİK BOZUKLUK VE NÖBETİN
EŞLİK ETTİĞİ OTİSTİK HASTALARDA CDKL5 GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Erdoğan

Danışman

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSU-11-3759 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ –2012

TEŞEKKÜR

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

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

Tezimin planlanmasındaki teşvik ve gayretlerinden dolayı Doç.Dr. Hakan Gümüş'e, Yrd. Doç.Dr. Didem B.Öztop'a, hasta temini konusunda yardımlarını aldığım Prof.Dr. Füsun Erdoğan'a, Çocuk Ve Ergen Ruh Sağlığı A.D ile Çocuk Nöroloji Bilim Dalı hoca ve çalışanlarına,

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

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme,

Bana huzurlu ve mutlu bir yuvanın tadını hissettiren, tezin tüm stresini benimle birlikte yaşayan ve tezimin yazımında katkıları olan sevgili eşim Zeynep'e, kızlarım Elif Eylül ve Deniz Ezgi'ye

En içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 EPİLEPSİ.....	4
2.1.1 Tanım	4
2.1.2 Tarihçe	4
2.1.3 Epidemiyoloji.....	5
2.1.4 Etyoloji.....	7
2.1.5 Epilepsi oluşum mekanizmaları (Epileptogenez)	8
2.1.6 Epilepsi sınıflandırılması	12
2.1.7 Dirençli epilepsi	19
2.2 OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI	26
2.2.1 Otistik bozukluk	26
2.2.2 Sendromik otizm.....	32
2.2.3 Nonsendromik otizm.....	37
2.2.4 Otizm, epilepsi ve EEG bozuklukları	40
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1HASTA VE KONTROL GRUPLARI	43
3.1.1 Hasta grubu	43

3.1.2 Kontrol grubu.....	43
3.2 KULLANILAN ALETLER.....	44
3.3 KULLANILAN KİMYASALLAR.....	44
3.3.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu İçin High Pure PZR Template PreparationKit’inde Bulunan Kimyasal Maddeler.....	44
3.3.2Gerçek zamanlı PZR Cihazında (LightCycler) Kullanılan Lightcycler Fast Start DNAMaster Probe setinde bulunan kimyasal maddeler	44
3.4 HASTA GRUBUNDA CDKL5 GENİNİN BELİRLENEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI İÇİN İZLENEN YÖNTEM	45
3.4.1 DNA eldesi.....	45
3.4.2 DNA saflığı ve konsantrasyonlarının ölçümü.....	46
3.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	47
3.5 RT-PZR YÖNTEMİ İLE CDKL5 GENİNDE A40V, I72N VE I72T, C152P, R175S,G178D VE P180L, R444C VE L879E POLİMORFİZMLERİNİN ANALİZİ	59
4. BULGULAR	62
4.1. CDKL5 GENİ MUTASYONLARI GENOTİPLEMELERİ	62
4.2. HASTA VE KONTROL GRUBU BULGULARI.....	68
4.3. HASTA GRUBU BULGULARI	69
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇLAR	93
KAYNAKLAR	96
TEZ ONAY SAYFASI.....	110

KISALTMALAR

AEİ	: Antiepileptik ilaç
ARX	: Aritaless related homebox gen
AS	: Angelman Sendromu
CDKL5	:Cyclin dependent kinaz like5
CGH	: Comperative genomic hybridization
CNV's	: Copy number variations
DEHB	: Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu
EEG	: Elektroensefalografi
EIEE-2	: Early infantily epileptic encephalopathy-2
IS	: İnfantil Spasm
ISSX-2	: X'e Bağlı İnfantil Spazm Sendromu
ILAE	:International League Against Epilepsy
MECP2	:methyl CpG binding protein 2
MLPA	: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MR	: Magnetik Rezonans
OB	: Otistik bozukluk
OSB	: Otizm spektrum bozukluğu
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PWS	: Prader-Willi Sendromu
RT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SNP	: Single nücleotide polymorphism
UTR	: Untransletad region(çevrilmeyen bölgeler)
YGB	: Yaygın gelişimsel bozukluklar
XCI	: X Kromozom İnaktivasyonu

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kanal mutasyonları	11
Tablo 2. ILAE 1999 Uluslararası epilepsi sınıflaması	14
Tablo 3. ILAE 2001 Epilepsi sendromları ve ilişkili durumlar.....	25
Tablo 4. Diğer sendromik otizm nedeni olan hastalıklar.	37
Tablo 5. Nonsendromik otizmden sorumlu aday genler	38
Tablo 6. Nonsendromik otizmde bazı genler, proteinler ve fonksiyonları.....	39
Tablo 7. Lightcycler Faststart DNA Master Probe seti içeriği.....	45
Tablo 8. PZR çeşitler	50
Tablo 9. Lightcycler 1.5 system ve 480 cihazında RT-PZR yönteminde analiz aşamaları	60
Tablo 10. Hasta ve kontrol grubu verileri	68
Tablo 11. Nöbet başlangıç yaşları	69
Tablo 12. Aile hikayesi	70
Tablo 13. Akraba evliliği.....	71
Tablo 14. MR anormalliklerinin karşılaştırılması	72
Tablo 15. EEG anormalliklerinin karşılaştırılması.....	72
Tablo 16. Politerapi durumları	73
Tablo 17. Mental durum	73
Tablo 18. OB hasta grubu verileri	74
Tablo 19. OB’ nun ilk fark edilme ve ilk tanı yaşı.....	74
Tablo 20. Değişiklik bulunan hastaların bulguları	75
Tablo 21. Değişiklik bulunan hastaların değişikliklerinin karakteristikleri	77

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil1. Epilepsi etyolojisi	7
Şekil 2. Epileptogenezin basitleştirilmiş gelişim şeması	9
Şekil 3. X kromozomunda CDKL5 geninin genomik lokalizasyonu	22
Şekil 4. Ekzonlar, CDKL5 geninin şematik sunumu	22
Şekil 5. UTR (untranslated region)	22
Şekil 6. CDKL5 proteini	23
Şekil 7. CDKL5 geninde sık görülen mutasyonların şematik gösterimi	25
Şekil 8. NanoDrop 2000 cihazı	47
Şekil 9. PZR döngüsü sıcaklık aşamaları	48
Şekil10. RT-PZR cevap eğrileri	52
Şekil 11. Sybergreen 1 varlığında PZR	53
Şekil 12. Hidroliz problemleri varlığında PZR	54
Şekil 13. Hibridizasyon problemleri varlığında PZR	55
Şekil 14. Simpleprobe analiz prensibi	56
Şekil 15. Simpleprobe formatı ile SNP tespiti	57
Şekil 16. Simpleprobe probunun erime eğrisi davranışının Lightcycler cihazındaki görünümü	57
Şekil 17. Simpleprobe dizaynı	58
Şekil 18. Lightcycler 480 sistemi	61
Şekil19. A40V genotipi için melting analizi	63
Şekil 20. I72N/I72T genotipi için melting analizi	63
Şekil 21. G178D genotipi için melting analizi	64
Şekil 22. C152P genotipi için melting analizi	64
Şekil 23. L879E genotipi için melting analizi	65

Şekil 24. R444C genotipi için melting analizi	65
Şekil 25. R175S genotipi için melting analizi	66
Şekil 26. P180L genotipi için melting analizi.....	67
Şekil 27. Aile hikayesi şematik görünüm	70
Şekil 28. Akraba evliliği şematik görünüm	71

İNFAİT VE ERKEN ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE DİRENÇLİ NÖBET, OTİSTİK BOZUKLUK VE NÖBETİN EŞLİK ETTİĞİ OTİSTİK HASTALARDA CDKL5 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

CDKL5 geni işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte beynin normal gelişiminde görev alan proteinlerin yapımında rol oynadığı düşünülen bir gendir. Bu gende bugüne kadar 90 civarında mutasyon bildirilmiştir ve bunların 50'ye yakını infanıl dönemde ve erken çocuklukta en az iki antiepileptik ilaç (AEİ) tedavisine rağmen ilerleyen nöbetlerle karakterize epilepsi, epilepsisiz otizm ve ılımlı epilepsi fenotipleri ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca MECP2 mutasyonunun negatif olduğu Rett Sendromunun atipik formu ve X'e Bağlı İnfanıl Spazm Sendromu ile de ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada CDKL5 geninde 119C>T (A40V), 215T>A/C (I72N,I72T), 455G>T (C152P), 525A>T (A175S), 533G>A (G178D), 539C>T (P180L), 1330C>T (R444C) ve 2635_2636delCT (L879E) polimorfizmleri ile dirençli nöbet ve otistik bozukluk arasındaki ilişkiyi Türk toplumunda değerlendirdik.

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nöroloji BD ve Nöroloji AD' da dirençli epilepsi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı AD' da DSM-IV tanı kriterlerine göre otistik bozukluk (OB) tanısı almış toplam 67 hasta ve (40 erkek, 27 dişi) ve 23 sağlıklı (10 erkek, 13 dişi) kişi dahil edildi. Kan örnekleri toplandıktan sonra, DNA eldesi yapıldı. Belirlenen mutasyonlar, gerçek zamanlı (Real-Time) PZR yöntemi ile araştırıldı. Hasta ve kontrol grubundan elde edilen bulgular karşılaştırıldı.

CDKL5 geni 525 A>T (A175S), mutasyonunu dirençli nöbet hasta grubunda 1 kız çocuğunun, 539 C>T (P180L) mutasyonunu ise yine dirençli nöbet hasta grubunda bir kız çocuğunun heterozigot taşıdığı bulunmuştur. Diğer mutasyonlara ise ne hasta ne de kontrol grubunda rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: CDKL5 geni, dirençli epilepsi, polimorfizm, otistik bozukluk, RT-PZR

A STUDY OF CDKL5 GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH PERSISTENT SEIZURE, AUTISTIC DISORDER AND SEIZURE IN ADDITION TO AUTISTIC DISORDER DURING INFANCY AND EARLY CHILDHOOD

ABSTRACT

Although the function of the gene CDKL5 is not completely clear, it is thought to carry a role in the production of the proteins that serve normal brain development. About 90 mutations of this gene were so far reported. Almost 50 of these, in infancy and early childhood, were associated with epilepsy, non-epileptic autism and mild epilepsy phenotypes characterized by progressive seizures despite treatment with at least two anti-epileptic drugs (AED). Furthermore, studies have shown that it is related to the atypical form of Rett Syndrome and X- Dependent Infantile Spasm Syndrome, where MECP2 mutation is negative. This study aims to evaluate the relevance of 119C>T (A40V), 215T>A/C (I72N,I72T), 455G>T (C152P), 525A>T (A175S), 533G>A (G178D), 539C>T (P180L), 1330C>T (R444C) and 2635_2636delCT (L879E) polymorphisms in the CDKL5 gene to persistent seizures and autistic disorder as observed in Turkish society. A total of 67 patients, 40 male and 27 females diagnosed with persistent epilepsy by the Pediatric Neurology and Neurology Department Clinics of the Erciyes University Faculty of Medicine and with autistic disorder according to DSM-IV diagnostic criteria (AD) by the Child and Adolescent Mental Health Department Clinic, as well as 23 healthy subjects (10 M and 13 F) as control participated in the study. DNA was extracted from collected blood samples. The mutations identified were examined with Real Time PCR methodology to compare the data obtained from the afflicted and control groups of subjects.

A girl patient in the persistent seizure group was found to carry the CDKL5 gene 525 A>T (A175S) mutation, while, again in the persistent seizure group, another girl with 539 C>T (P180L) mutation carried a heterozygote. No other mutations were reported either in the patient or control groups.

Keywords: CDKL5 gene, persistent epilepsy, polymorphism, autistic disorder, RT-PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi bütün yaş gruplarında en sık görülen, bulaşıcı olmayan, önemli bir maluliyet ve mortalite nedeni olan nörolojik bir durumdur. Beyindeki hücrelerin kontrol edilemeyen, ani, aşırı ve anormal deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkar. Epileptik nöbet beyinde kuvvetli ve ani elektriksel boşalım sonucu oluşan kısa süreli ve geçici bir durumdur (1).Epilepsi ise nöbetin sebepsiz olarak en az iki kere tekrarlaması neticesinde oluşur.

Epilepsi tüm dünya üzerinde, bütün ırklarda ve cinsiyet farkı gözetmeksizin görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmanın verilerine göre tüm dünyadaki hastalık yükünün yaklaşık %0,5'ini oluşturmaktadır (2). Aktif epilepsi prevalansı yaklaşık 4-10/1000 iken insidansı yılda 20-50/100.000 olarak bildirilmektedir. Bu veriler sosyoekonomik durum, çevresel etkenler ve sağlık hizmetlerinin ulaşılabilirliğine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir.

Vakaların yarısından fazlasının etyolojisi henüz aydınlatılamamıştır (Primer/idiopatik). Bununla birlikte etyolojik faktörlerin bilindiği durumlarda bile bazen sebep açıkça ortaya konamamaktadır. Primer grupta son yıllarda genetik sebepler ön plana çıkmıştır.

Dirençli epilepsi tanımı için bir çok kriter kullanılabilir fakat bütün amaçları içine alan bir tanım söz konusu değildir. Tam olarak nöbetleri kontrol altına alınmamış her hasta ilaca dirençlidir. Bu tanımlama tıbbi veya cerrahi tedavinin değerlendirilmesinde kullanılamaz. Tıbbi dirençlilik iki ya da üç antiepileptik ilaç (AEİ) kullanımına rağmen nöbetlerin olması olarak tarif edilir. Hasta tarafından bakıldığında dirençlilik nöbetlerin şiddet ve sıklığına bağlıdır ve bunların hayat kalitesine yaptığı kötü tesirdir, aynı

zamanda AEİ'ların yan tesiri de önemlidir. Doktor içinse dirençlilik sadece tanımlamaya değil aynı zamanda tanının doğruluğuna bağlıdır. En sık direnç nedenleri arasında ilaç düzeyinin yetersizliği, nöbetin başlangıç yaşı, etyolojisi gibi nedenler sayılabilmektedir. İdiopatik grup içinde yer alan bazı genetik nedenler hastanın dirençli epilepsi sebebi olabilmektedir. Bunlar arasında CDKL5 geni erken başlangıçlı dirençli epilepsi sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır.

Otistik bozukluk (OB) çocukluk çağı nöropsikiyatrik bozukluklarından birisidir(3). OB ile birlikte 5 hastalık Yaygın Gelişimsel Bozukluk/Otizm Spektrum Bozuklukları (YGB/OSB) olarak adlandırılan grubun içerisinde yer almaktadır. Bunlar Rett Bozukluğu (RB), Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu (ÇDB), Asperger Bozukluğu (AB) ve Başka Türli Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar(BTA-YGB)'dır. OB, YGB'ların yaklaşık %20-40'ını oluşturmaktadır. Etiyolojisinde çeşitli faktörler suçlanmaktadır. Ailesel, çevresel, biyokimyasal, endokrin, immunolojik ve genetik etkenler en önde gelenleridir. OSB'da genetik araştırmalar son yıllarda ciddi artış göstermektedir. Kromozom anormallikleri, gen kopya sayısı varyantları(CNVs) ve tek gen hastalıkları bilinen genetik kökenli OSB nedenleridir. Pek çok kromozom anormalliğine otizm bozukluğu eşlik etmektedir. Otizmde hemen hemen her kromozomda anormalliğe rastlanmış olmasına rağmen, sadece birkaç lokus otizmle yakından ilişkilendirilmiştir(4).CNVs'lerden en bilinenleri 16p 11.2 Delesyon Sendromu, 15q13.3 Delesyon Sendromudur. Tek gen hastalıklarından ise bilinen en sık durumlar Fragil X, Rett Sendromu, Tuberoskleroz Kompleksi, Nörofibromatozis Tip1 (NF1) gibi hastalıklardır.

Rett Sendromunda MECP2 geninde mutasyon bulunurken bazı görünüşte Rett Sendromu olan kız hastalarda nöbetlerin baskın olduğu ve 6.aydan önce hastalığın ortaya çıktığı fark edilmiştir. Bu hastalarda MECP2 gen mutasyonu negatif bulunurken CDKL5 geninde mutasyona rastlanmıştır.

CDKL5 geni normal beyin gelişimi için gerekli bir proteinin yapımında görev almaktadır ki bu proteinin işlevi tam olarak açıklanamamakla birlikte bazı genlerin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Bu genin mutasyonlarına Rett Sendromunun atipik formu da denilen erken başlangıçlı ve dirençli nöbetlerle karakterize ve MECP2 gen mutasyonunun olmadığı infant dönemi çocuklarda rastlanmıştır. Early Infantile Epileptic Encephalopathy-2(EIEE-2) ve X'e Bağlı Infantil Spazm (ISSX-2) denilen durumlarla ilişkilidir. Mutasyonlara sıklıkla kız hastalarda

rastlanmakla beraber erkek hastalarda da belirlenen mutasyonlar vardır (5). Fakat epileptik ensefalopatili erkek hastalarda nadirdir.

CDKL5 mutasyonları Angelman Sendromu, epilepsi göstermeyen otizm ve ılımlı epilepsi fenotipleri ile de ilişkili bulunmuştur. Vakalarda otistik bulgular, mental retardasyon ve özellikle erken başlangıçlı dirençli nöbetler dikkati çekmektedir (6). Erken başlangıçlı dirençli nöbetleri olan kız hastalarda mutasyon oranı %9 civarında iken ilaveten infantil spazmın olduğu durumlarda bu oran %28'e çıkmaktadır (7). Belirlenen mutasyonların çoğunluğu tek vaka şeklindeyken nadir de olsa tekrarlayan vakalar vardır.

Literatürde şimdiye kadar bildirilen 90 civarında mutasyon vardır. Bunların çoğunluğu missens/nonsens ve delesyon, insersiyon tipi mutasyonlardır. Patojenik mutasyonlar sıklıkla genin N-terminal bölgesinde yoğunlaşırken dirençli nöbetlerin olduğu durumlarda C-terminal bölgesinde sık bulunmuştur.

Bu çalışma infantil dönemde dirençli epilepsisi, OB ve nöbete ilaveten OB olan 3 hasta grubunda ve benzer yaş aralığındaki sağlıklı bireylerde CDKL5 geninin literatür araştırması ile belirlenen, c.119C>T(A40V),c.215T>A/C(I72N,I72T), c.455G>T(C152P), c.525A>T(A175S), c.533G>A(G178D), c.539C>T(P180L), c.1330C>T(R444C), c.2635_2636delCT (L879E) mutasyonlarını Real-Time PZR yöntemi kullanarak araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EPİLEPSİ

2.1.1. Tanım

Epilepsi; Merkezi Sinir Sisteminde belirli bir işlevi olan nöron topluluğunun ani, anormal ve hipersenkron deşarjı olarak tanımlanır. Bu tanımlama daha geniş anlamda nöronların somatik, psişik, motor, duysal veya otonomik fenomenle birlikte olan, beyin fonksiyonlarındaki geçici ve yineleyici bozuklukları kapsar(8,9). Kelime anlamı olarak Eski Yunanca’ da ‘kavramak’ ve ‘yakalamak’ manasına gelen “*epilamvalein*” fiilinden türetilmiştir (10). Buna karşın nöbet kelimesinin karşılığı olarak kullanılan “seizure” kelimesi tutmak, yakalamak, ele geçirmek anlamındaki “to seizure” fiilinden gelişmiştir (11). Klinik bir antite olarak ise epilepsi herhangi bir zamanda tespit nedenine göre sebepsiz (iki veya daha fazla) tekrarlayan epileptik nöbetler ile karakterize bir durum olarak tanımlanır (12,13). Sadece ateşli nöbeti olan (14), sadece neonatal nöbetleri (yaşamın ilk 30 günü içinde olan nöbetler) ve akut semptomatik nöbetleri (akut sistemik hastalık, zehirlenme, madde bağımlılığı ya da yoksunluk veya akut nörolojik hakaretler ile ilişkili nöbetler) olanlar ve tek bir nedensiz nöbeti olan bireyler bu kategoriye dahil değildir.

2.1.2. Tarihçe

Epilepsi insanoğlunun bilinen en eski hastalıklarındandır (15). Hastalığa ilişkin en eski kayıtlar Mezopotamya uygarlığına aittir ve Babil kralı Hammurabi’ nin ünlü yasalarının 278. maddesinde bu hastalığa yakalanan kölelerin satıcısına geri iade edileceği

hususunun vurgulanması hastalığın o dönemlerdeki önemini ortaya koymaktadır. Hipokrat M.Ö 460 yılında epilepsiyi beyin yerleşimli bir hastalık olarak tanımlamış ve bu hastalığa ‘*mal caduque*’ adını vermiştir (16). 19.yy’da İngiliz hekim J. Hughlings Jackson’un (1835-1911) çalışmalarıyla epileptolojide modern döneme geçilmiştir. Jackson’un yapmış olduğu tanımlamada epilepsi gri maddenin zaman zaman ortaya çıkan ani, aşırı, hızlı ve lokal boşalmaları olarak değerlendirilmiştir (17-19). Epileptik nöbet (seizure); anormal, aşırı, yada senkronize nöronal belirti ya da bulguların geçici olarak oluşumuna verilen addır. Epilepsi ise bu tip bir nöbetin spontan olarak en az iki kere tekrarlaması söz konusu olduğunda kullanılan bir tanımlamadır (20). Son yüzyılda epilepsi kavramı; pek çok klinisyenin gözlemlerinin birikimi ile ve nörofizyoloji, görüntüleme, genetik ilerlemelerin de katkısıyla oluşturulmuştur (21).

2.1.3. Epidemiyoloji

Epilepsi insanoğlunun bilinen en yaygın ve bütün yaş gruplarını en sık etkileyen nörolojik hastalığıdır. Herhangi bir anda, dünya üzerinde 50 milyon kişinin epilepsi hastası olduğu tahmin edilmektedir (22). Ancak dünya çapında bu hastalığın prevalans ve insidansı söz konusu olduğunda eşit bir dağılım yoktur. Bununda başlıca sebepleri arasında çalışma metodlarının ve populasyon yapılarının farklılığı gelmektedir (23).

2.1.3.1. Prevalans:

Epilepsi prevalansı; belirli bir nüfusta, belirli bir zaman dilimi içerisinde, çalışma kapsamında yer alan epilepsi hastalığına sahip tüm olguların oranıdır. Aktif prevalans son 5 yıl içinde nöbet geçiren veya antikonvülzan ilaç alan kişiler için kullanılır.

Yapılan çalışmalarda Kuzey Amerika’da yaş ile düzeltilmiş epilepsi prevalansı, bir çalışmada 7.1/1000 iken bir diğer çalışmada 5.0/1000’dir (24,25). Orta ve Güney Amerikada yapılan çalışmalarda ise 3.7-22.2/1000 arasında değişen oranlar elde edilmiştir (26,27). Bu anlamlı fark endemik durumlar ör: Nörosistisierkoz veya Malaria, önleyici sağlık hizmetleri ve ulaşılabilir tıbbi tedaviler gibi sağlık altyapısı ile ilişkili sorunlar sonucu olabilmektedir.

Avrupa kaynaklı çalışmalarda İtalya’da 2.7/1000 oranı elde edilmişken ülkemizin batı kesiminde bu oran 7.0/1000 olarak bulunmuştur (28,29). Hollanda da yapılan bir çalışmada 0-18 yaş arası adölesan ve çocuklarda prevalans; erkek çocuklarda 4.77, kızlarda ise 4.55/1000’dir (30). Yapılan çalışmaların çoğunda ergenlik veya erken erişkinlik döneminde epilepsi prevalansının artışı yönünde genel bir eğilim dikkati

çekmektedir (31-34). Epilepsi prevalansı sosyoekonomik düzeyle de ilişkili bulunmuştur. Gelişmiş ülkelerde prevalans oranı ortalama 6/1000 iken, gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde bu oran 18.5/1000 civarındadır (21,35-38). Gelişmiş ülkelerde epilepsi prevalansı erişkin yaş grubunda stabil bir durumda iken 50 yaş üzerinde artma eğilimi göstermektedir (37,39). Gelişmekte olan ülkelerde ise üçüncü ve dördüncü on yıllık dönemdestabil iken beşinci dekaddan sonra tipik olarak düşmektedir (31-33).

Prevalans erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Ancak toplumda cinsiyete özgü mutlak fark minimaldir. Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise E/K prevalansı 5.1/2.2 bulunmuştur. Bu farkın nedeni ise bu hastalığın evliliğe engel olması nedeniyle kadınlar tarafından gizlenilmesi olarak düşünülmüştür (40).

Etnik farklılıklar açısından yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmakla birlikte Afro-Amerikan topluluğunda beyaz ırka göre prevalansı daha yüksektir (24). Yine benzer bir çalışmada prevalans hızı Güney Asya popülasyonuna göre Güney Asyalı olmayanlarda daha yüksek bulunmuştur (41).

2.1.3.2. İnsidans

Epilepsi insidansı; belirli bir zaman periyodunda epilepsili yeni vakaların sayısı olarak tanımlanır.

Kuzey Amerika kaynaklı bir veride epilepsi insidansı (yaş ile düzeltilmiş) 16/100.000 ile 51/100.000 arasında değişmektedir (42,43). Güney Amerika’da yapılan bir çalışmada ise dünyadaki en yüksek epilepsi insidansı 111/100.000 ile Şili’nin kırsal kesiminde bulunmuştur (32). Avrupa’da ise bu oran 47/100.000 oranında tespit edilmiştir (44). Gelişmiş ülkelerde görülmüştür ki epilepsinin insidansı yaşamın ilk yılında ve erken çocuklukta en yüksek, adölesan sonrasında stabil, erişkin dönemden beşinci on yıla doğru ise azalmaktadır (43,45-48). Bütün nöbetlerin yaklaşık %75’i 20 y altında iken en yüksek insidans 10 y altında görülmektedir (40).

Çoğu çalışmada erkeklerde epilepsi insidansı kadınlara göre yüksek bulunmuştur, fakat bu bulgu nadiren önem arz etmektedir. İzlanda ve Amerika’da kümülatif insidans erkeklerde belirgin bir fazlalık göstermektedir (43,48).

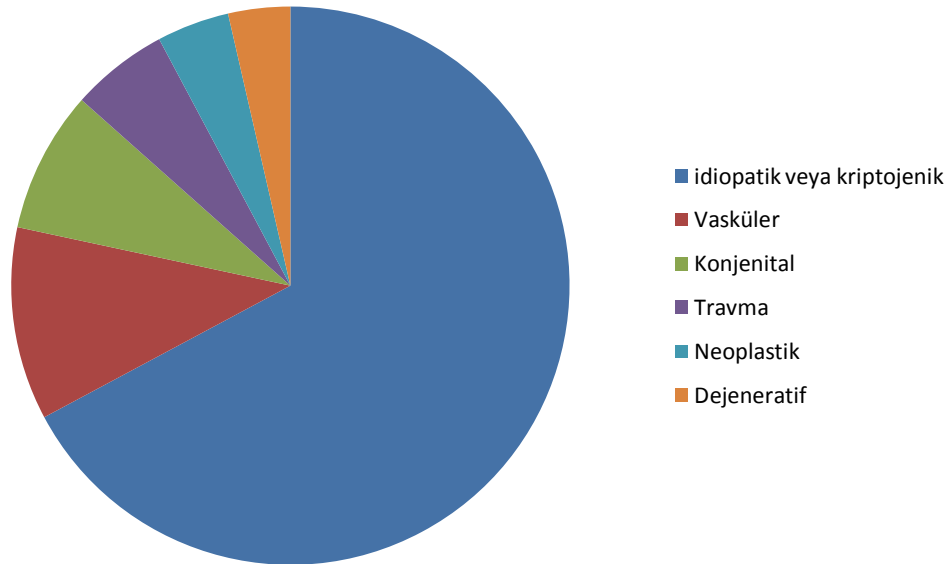
Etnik ve sosyoekonomik durumlar açısından yapılan çalışmalarda; non-Hispanik beyazlar, Afro-Amerikalılar, Hispanikler ve Asyalılar arasında anlamlı istatistiksel

farklılıklar bulunmamıştır. Bunun yanında insidansın varlıklı topluluklara göre daha düşük sosyoekonomik statüde olanlarda artış gösterdiği bulunmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde insidans epilepsiye neden olan faktörlerden dolayı daha yüksektir. Doğum travması, kafa travması, enfeksiyon gibi nedenler insidansın artışına sebep olurlar (36).

2.1.4. Etyoloji

Epilepsi ile ilgili şimdiye kadar yapılan araştırmalarda, hastaların yaklaşık %50'sinde nöbetlere neden olabilecek herhangi bir nörolojik bozukluk saptanmamıştır. SSS'de bilinen bir patoloji olmaksızın ortaya çıkan ve muhtemelen herediter faktörlerin etkin olduğu epilepsiler *primer/idiopatik epilepsiler* olarak isimlendirilirler. Burada daha sıklıkla primer terimi tercih edilmiştir. İdiopatik'ten kasıt ise genetik temeli sağlam olan ve spesifik gen defektleri ile ilişkili sendromlardır.

Eğer etyolojide klinik ve laboratuvar bulgularıyla belirlenebilen bir etken varsa *sekonder /semptomatik epilepsi* denir. Epilepsi semptomatik fakat etken yeterince açık bir şekilde ortaya konamıyorsa *kriptojenik epilepsi* tabiri kullanılır ki; etyolojisi bilinmeyen durumlarda kriptojenik nöbetler hâkimdir. Etyolojik sebeplerin oranları şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1: Epilepsi etyolojisi

Genetik faktörler idiopatik grupta semptomatiklerden daha fazla etkilidir. Nöbetlerin fenotipin bir parçası olduğu 200'ün üzerinde mendelyen hastalık vardır. Bu hastalıklar tüm epilepsilerin ise %1'ini oluşturmaktadır ve nörokutanöz, nörodejeneratif, kalıtsal metabolik hastalıklar ve kalıtsal kortikal gelişim malformasyonlarını kapsar. Epilepsili

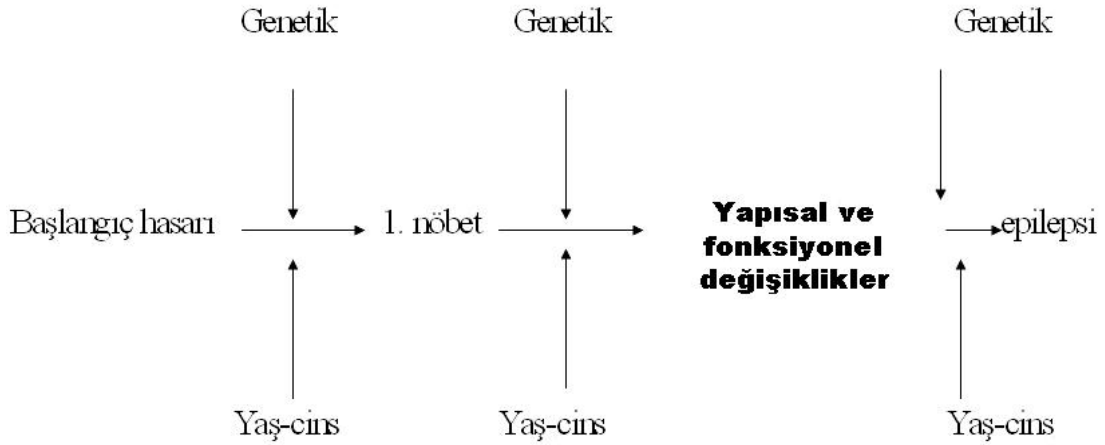
kalıtsal hastalıklar kalıtım mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar: Epilepsinin fenotipin bir parçası olduğu Mendelyen hastalıklar, Mendelyen kalıtmıli idiopatik epilepsiler, kompleks kalıtmıli epilepsiler, sitogenetik anomalilerle birlikte olan epilepsiler (49). İdiopatik epilepsiler sıklıkla kompleks kalıtmıli olmakla birlikte basit kalıtmıli olanlarda vardır. Bunlar arasında;

- **Benign familyal neonatal konvülzyonlar (BFNC):** O.D kalıtmılidir 20. ve 8. kromozomlarda tanımlanan potasyum kanal genleri olan KCNQ2 veKCNQ3 genleri ile ilişkilidir
- **Benign familyal infantil konvülzyonlar (BFIC):** O.D kalıtmılidir, genleri henüz tanımlanamamıştır.16 ve 19.kromozomlarda bağlantı analizleri yapılmaktadır.
- **Otozomal dominant nokturnal frontal lob epilepsi (ADNFLE):**20,5 ve 1. kromozomlarda tanımlanan 3 mutasyon bulunmuştur.
- **İşitsel bulguların olduğu familyal parsiyel epilepsi:**Familyal temporal lob epilepsisinin yaş bağımlı tipidir.
- **Familyal epilepsi değişken odaklı-familial epilepsy with variable foci (FEVF)** 22. kromozomda lokalize fakat kesin geni belli olmayan bir sendromdur.
- Kompleks kalıtmılılar arasında ise;
- **Juvenil myoklonik epilepsi:**
- **İdiopatik jeneralize epilepsi:**
- **Jeneralize epilepsi, febrile nöbetle birlikte:**
- **Çocukluk çağı absens ve febril nöbetleri:**
- **Benign rolandik epilepsi:**Yaşa bağıli bir epilepsi sendromudur.
- **Febril nöbetler:** O.D kalıtım gösterebilirler. Ayrıca multifaktöryel kalıtımda görülebilir. Bağlantı analizleri sonucunda 8. ve 19. kromozomlarda febril konvülzyon'a hassasiyet ile ilgili genlere rastlanmıştır.

2.1.5. Epilepsi Oluşum Mekanizmaları (Epileptogeneze)

Epilepsi nöronal hiperekstabiliteden kaynaklanan, kronik olarak tekrarlayan, tetiklenmemiş nöbetlerle giden tabloyu tanımlayan klinik bir durumdur. Nöbet ise gri maddedeki artmış elektriksel boşalmalar için kullanılan bir terimdir. Nöbetler belli bir süre sonra kendiliğinden veya tetikleyen faktörlerle birlikte tekrarlayan bir hal alır. Epilepsi sendromu ise belli nöbet tipleriyle birlikte ona eşlik eden klinik ve laboratuvar bulgularının tümünü tanımlar.

Epileptogenez terimi bir beyin hasarı neticesinde hücrel ve moleküler değişikliklerden kaynaklı beyin uyarılabilirliğinin artışı ve tekrar eden ani nöbetlerin görölmesi olarak ifade edilmektedir (50). Normal bir beyin zaman içinde bir dizi hücrel veya moleküler, yapısal ve/veya fonksiyonel değişikliklere maruz kalarak epileptik bir beyin haline dönüşmesi, kalıcı bir şekilde ve spontan olarak nöbet oluşturabilme özelliği kazanması sürecini ifade eder. Başlangıç hasarını takiben sessiz bir dönemden sonra spontan nöbetler ortaya çıkar. Bu dönemde çeşitli faktörlerinde etkisiyle reseptörlerde değişiklikler, hücre ölümleri meydana gelir. Süreç aylar-yıllar içinde gelişir (şekil 2). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda akut epileptogenez teriminden de bahsedilmektedir.



şekil 2: Epileptogenezin basitleştirilmiş gelişim şeması

Epileptogenezisin gelişiminde uyarılabilirliğinin artışından sorumlu olabilen temel faktörler:

- 1- İntinsik deşarj yaratacak pacemaker nöron membranlarının kapasitesi: Epileptojenik odak olarak adlandırılan bölgede pacemaker hücreler yer almaktadır ve bu hücreler tam olarak bilinmeyen nedenlerle artmış uyarılma ile anormal ateşlenme özelliği gösterirler ve etraflarındaki hücreleri de bu ateşlenmeye ortak edebilecek güçleri vardır (38).
- 2- GABA (Gaba–amino-butirik asit) inhibisyonun azalması: γ - aminobütirikasid (GABA) beyindeki nöronal eksitabilitenin ana inhibitörüdür bu etkisini GABAA ve GABAB reseptörleri aracılığıyla gerçekteştirmektedir (51).

3-Tekrarlayan eksitator alanlarda sinaptik uyarılmanın artışı: Sekonder epilepsi sendromlarında glutamaterjik sistem önemli bir yer tutmaktadır. Birçok epilepsi çeşidinin aşırı glutamaterjik sinaptik iletim bozukluğundan kaynaklanabileceği öngörülmektedir (52). Glutamat, beyindeki en önemli eksitator nörotransmitterdir. Nöronların intrinsik membran özellikleri ve inhibitör/eksitator oranları uyarılda önemlidir. Nöronal iletişimde fizyolojik mekanizmaların değişimi nöronal aktivitenin senkronizasyonunu yöneten proepileptik durumlardan sorumludur.

Hipersenkronizasyonun altında yatan nedenlerin ve çeşitli nöronal toplulukların arasındaki hipersenkronizasyonun rolünün anlaşılması epilepsi mekanizmasının anlaşılmasında en önemli basamaklardandır. Piramidal hücrelerin tekrarlayıcı uyarılması ise senkronizasyonun temelini oluşturmaktadır (53).

Bazı epileptik sendromlarda genetik faktörlerinde rolü olduğu gösterilmiştir. Günümüzde idiopatik epilepsi sendromlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiş ondan fazla iyon kanal alt ünitesi geni mutasyonu tanımlanmıştır. Hastalığın nedeni bu mutasyonlara bağlanmıştır ve epileptogenezin kanal patolojileri ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte son yıllarda iyon kanallarından bağımsız bazı genlerin de epilepsiye neden olabildiği genetik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Fakat monogenetik kalıtım şekilleri tanımlananlar hariç, genetik analizler, fenotipik ve genotipik heterojenitenin işe karışması nedeniyle, epileptik sendromların kalıtım özelliklerini açıklamakta yetersiz kalabilmektedirler (54).

Monogenik kalıtlı epilepsilerinin çoğu, nöronal iyon kanallarını kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (55).

Tablo1: Kanal mutasyonları

İyon Kanalı	Gen	Fenotip	Kalıtım
Sodyum	SCN1B	GEFS+	Tek gen
	SCN1A	GEFS+/SMEI	Tek gen
	SCN2A	BFNIC	Tek gen
Potasyum	KCNQ2	BFNIC	Tek gen
	KCNQ3	BFNIC	Tek gen
	KCND2	mTLE	Bilinmiyor
Klor	CLCN2	IGE	Tek gen
Kalsiyum	CACNA1A	CPS, GTCS	Tek gen
	CACNA1H	CAE, IGE	Kompleks
	CACNB4	IGE	Kompleks
Asetilkolin Reseptörü	CHRNA4	ADNFLE	Tek gen
	CHRNA2	ADNFLE	Tek gen
	CHRNA2	ADNFLE	Tek gen
GABA Reseptörü	GABRG2	CAE/GEFS+FS	Tek gen
	GABRA1	ADJME, CAE	Tek gen

ADNFLE: Otozomal dominant nokturnal frontal lop epilepsi,

BFNC: Benign ailesel neonatal konvulsiyonlar

BFNIC: Benign ailesel infantil konvulsiyonlar

GEFS+: Febril nöbetli jeneralize epilepsi

SMEI: Süt çocukluğu dönemi şiddetli miyoklonik epilepsi

CPS: Kompleks parsiyel nöbetler

GTCS: Jeneralize tonik klonik nöbetler

mTLE: Mesial temporal lop epilepsisi

ADJME: Otozomal dominant juvenil miyoklonik epilepsi

CAE: Çocukluk çağı absans epilepsisi

İyon kanallarındaki mutasyonlar eksitator ve inhibitör nörotransmisyonun etkinliğinin değişmesine yol açmakta; bunun sonucunda eksitator nörotransmisyonun artmasına ya da inhibitör fonksiyonun kaybına neden olmaktadır.

2.1.6. Epilepsi Sınıflandırması

Geçmiş oldukça eski çağlara dayanan bu hastalığın sınıflandırılması antik çağlardan beri uğraşılan konulardan biridir. M.Ö 2.yy'da Galen tarafından, beyinden kaynaklanan idiyopatik nöbetlerden ve vücudun herhangi bir bölgesinden kaynaklanan semptomatik nöbetlerden söz edilmiştir. 18.yy'a kadar epileptik sendromlar epileptik nöbetlerin karakteristikleri ile tanınmış ve bu nedenle epileptik nöbetler ile sendromların sınıflandırılması arasında büyük bir fark gözetilmemiştir. Ancak 1900'lü yılların başında sendrom ile epileptik nöbet tanımlarının farkı anlaşılmış ve farklı tip epilepsi sendromlarını tanımlamak için nöbetlerin klinik karakteristiklerine ek klinik özellikler eklenmeye başlanmıştır (56). 21. yy' da ise insan genom çalışmaları ve teknolojik gelişmelerin ışığında daha detaylı hale gelmiştir.

Günümüz sınıflama çalışmaları ortak bir dil oluşturarak iletişimi kolaylaştırma, eldeki bilgileri ortak havuzlarda toplayarak karşılaştırma ve tedavi seçiminde bu bilgileri en doğru biçimde kullanabilme isteğinden doğmuştur. Epilepsinin farklı ve benzer özellikleri olan birçok hastalık grubunu içermesinden dolayı sınıflama sistemli bir yaklaşım olanağı sağlar. Sonuç olarak epilepsilerin sınıflanması:

- Kavrama, eğitim ve öğretim,
- İletişim; meslektaşlar arasında aynı-ortak dili kullanmak,
- Patofizyolojik açıdan ortak ve ayrı yönleri saptamak,
- Etiyolojik yaklaşıma katkı sağlamak,
- Ortak bilimsel çalışmalar için gereklilik,
- Prognoz ve tedavi hakkında yol gösterme,
- Epilepsi nöbetlerinin sebebini anlamada ilerleme sağlamak açılarından önemlidir.

Epilepsi sınıflaması daha iyi yapabilmek ve anlamak için öncelikle sendrom ve nöbet terimlerini iyi anlamak gerekir. Epileptik nöbet; beyindeki anormal ve aşırı nöronal aktiviteye bağlı olarak geçici semptom ve bulguların ortaya çıkması halidir (57). Bundan dolayı nöbetler doğrudan gözlem, dinleme veya kamera kaydı izlenmesi sonucunda sınıflandırılır.

Epileptik sendrom ise; farklı etyolojileri olan tek bir epilepsi durumunu tanımlayan belirtiler ve bulgular bütünüdür. Yalnız nöbet tipinden başka şeyler de içermelidir yani örnek olarak tek başına frontal lob nöbetleri bir sendrom oluşturmaz. Bu tanımdan da anlaşılacağı üzere sendrom sınıflaması yapabilmek ve tanı koyabilmek için hastanın epileptik nöbetlerinin aksine hastalığın başlangıç yaşına, aile öyküsüne, nöbetlerin sıklık derecesine, EEG kaydı gibi görüntüleme yöntemlerine de ihtiyaç vardır (19,57). 1960'lı yıllarda epileptik nöbetlerin ve epilepsilerin sınıflandırılmasının ilk temelleri atılmıştır. International League Against Epilepsy (ILAE) 1970'te epileptik nöbetler ve epilepsi sınıflamalarını oluşturmuştur. Bu sınıflamanın yetersiz görülmesi üzerine uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda 1981 ve daha sonra 1989 yılında, bugünde halen kullanılan epileptik nöbetlerin ve epilepsi sendromlarının sınıflandırılması son şeklini alarak ortak bir dil oluşturulmuştur. 1998 yılında Dr. Lüders ve arkadaşları semiyolojik nöbet sınıflamasını önermişlerdir. Yani sadece görülen nöbete veya tarifine bakarak sınıflama yapmışlardır. Diğer taraftan epilepsilerde klinik seyir, prognoz, etyoloji ve dolayısıyla tedavi yaklaşımının çok farklı özellikler gösterebileceği dikkate alındığında yalnızca nöbetlerin sınıflandırılması yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı ILAE 1989 sınıflaması geçerliliğini halen korumaktadır.

ILAE 1989 epilepsi sendrom sınıflamasında 2 ana ayırım vurgulanmaktadır:

1-Fokal kortikal bir lokalizasyondan kaynaklanan parsiyel epilepsiler ile jeneralize olanların ayırımı

2-İdiopatik/primer olanlarla semptomatik /sekonder olan epilepsilerin ayırımı

İdiopatik sendromlara sıklıkla nörolojik disfonksiyon eşlik etmez, gelişim basamakları normaldir, altta yatan herhangi bir patolojik süreç yoktur. Ailesel özellik genellikle dikkat çeker, nöbetler daha seyrek ve tedaviye yanıt daha iyidir. İdiopatik form genelde daha iyi bir prognoz gösterir ve remisyon olasılığı yüksektir.

Semptomatik epilepside ise altta yatan bir beyin hastalığı ve bunun neticesinde nörolojik bozukluklar, EEG'de temel aktivitede yavaşlama saptanır. Hikâyesinde nöbete neden olabilecek bir SSS hastalığı, kafa travması enfeksiyon, gelişmekte olan tümör, dejeneratif hastalıklar bulunur. Tedaviye cevap değişkendir ve spontan remisyon olasılığı düşüktür.

Kriptojenik epilepsi kognitif etkilenme veya nörolojik defisitinin olduğu, edinsel bir nedeni olması gerektiği düşünülen ancak saptanamayan epilepsiler için kullanılan bir terimdir. (Lennox Gastaut Sendromu, Doose Sendromu vb)

Epilepsi sendrom sınıflamasında temel alınan özellikler:

- Nöbet şekilleri
- Nöbetin başlangıç yaşı
- EEG bozukluğunun tipi
- Beraberindeki nörolojik bulgular

Tablo 2: ILAE 1989 Uluslar arası Epilepsi Sınıflandırması

I. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve sendromlar

1.1.İdyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- a)Santrot temporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- b)Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi
- c)Primer okuma epilepsisi

1.2.Semptomatik

- a)Temporal lob epilepsisi
- b)Frontal lob epilepsisi
- c)Parietal lob epilepsisi
- d)Oksipital lob epilepsisi
- e)Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsiyalis kontinuası
- f)Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar

1.3.Kriptojenik

II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

2.1.İdiopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- a)Selim ailesel yenidoğan konvülsyonları
- b)Selim yenidoğan konvülsyonları
- c)Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi
- d)Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolesi)
- e)Jüvenil absans epilepsisi
- f)Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal)

- g)Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi
- h)Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
- i)Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler

2.2.Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)

- a)West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe
- b)Lennox-Gastaut sendromu
- c)Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi
- d)Miyoklonik absanslı epilepsi

2.3.Semptomatik

2.3.1.Spesifik olmayan etyolojili

- a)Erken miyoklonik ensefalopati
- b)Supression-burst' lu erken infantil epileptik ensefalopat
- c)Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

2.3.2.Spesifik sendromlar

III. Fokal veya jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler

3.1.Jeneralize ve fokal nöbetli epilepsiler

- a)Yenidoğan konvülsiyonları
- b)Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
- c)Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi
- d)Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
- e)Diğer belirlenemeyen epilepsiler

3.2.Jeneralize veya fokal özelliği ayırdedilemeyenler (uykuda gelen grand mal nöbet olguları gibi)

IV. Özel (özgün) sendromlar

4.1.Duruma bağlı nöbetler (Gelegenheitsanfaelle)

- a)Febril konvülsiyonlar
- b)İzole nöbet veya izole status epileptikus
- c)Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

Tabloda belirtilen ILAE(1989) sınıflaması semptomatolojik ve etyopatogenetik olmak üzere 2 ana eksen üzerine yapılmıştır.

ILAE yürütme kurulu, halen kullanılmakta olan nöbet sınıflaması (1981) ve epilepsilerin ve epilepsi sendromlarının sınıflamasının (1989) önerilmesinden beri çok fazla gelişme olduğunu göz önüne alarak bu sınıflamaları gözden geçirme kararı almış ve bu konuyla ilişkili olarak bir çalışma grubu oluşturmuştur. Bu çalışma grubu kullanılmakta olan sınıflamanın aynı sistem içinde güncelleştirmenin mümkün olamayacağına karar vermiş ve her bir hastayı tanımlamakta kullanılacak tanısallık bir şema önermiştir. Epileptik nöbetler ve sendromlar standart bir terminoloji ile sınıflanmalı, ancak bazı pratik ve dinamik yönleri de içerecek kadar esnek olmalıdır. Tanı amaçlı şema 5 eksene ayrılmıştır. Bunlar; İktal fenomenoloji, nöbet tipi veya tipleri, sendrom, etyoloji ve sakatlıktır (58). Epileptik sendrom farklı etyolojileri olan tek bir epilepsi durumunu tanımlayan belirtiler ve bulgular bütünüdür. Yalnız nöbet tipinden başka şeyler de içermelidir. Bu tanıma göre sınıflandırılan epilepsi sendromları ve ilişkili durumlar aşağıda belirtilmiştir.

Epilepsi sendromları ve ilişkili durumlar-ILAE 2001'e göre

- Benign familyal neonatal nöbetler
- Erken myoklonik ensefalopati
- Ohtahara sendromu
- İnfant dönemin parsiyel nöbetleri
- West Sendromu
- İnfant dönemin Benign myoklonik epilepsisi
- Benign familyal ve nonfamilyal infantil nöbetler
- Dravet Sendromu
- HH sendromu
- İlerleyici olmayan hastalıklarla seyreden myoklonik ensefalopati
- Sentrotemporal dikenlerle seyreden Benign çocukluk çağı epilepsisi
- Erken başlangıçlı benign çocukluk çağı oksipital epilepsi(Panayiotopoulos tipi)
- Geç başlangıçlı çocukluk çağı oksipital epilepsi (Gastaut tipi)
- Myoklonik absanslarla seyreden epilepsi
- Myoklonik astatik nöbetlerle seyreden epilepsi
- Lennox-Gastaut sendromu

- Landau-Kleffner sendromu
- Uykuda sürekli diken dalga deşarjları ile seyreden epileptik ensefalopati
- Çocukluk çağı absans epilepsiler
- Progresif myoklonik epilepsiler
- İdiopatik jeneralize epilepsiler -değişken fenotipli
 - Juvenil absans epilepsi
 - Juvenile myoklonik epilepsi
 - Jeneralize tonik-klonik nöbetli epilepsiler
- Reflex epilepsiler
 - İdiopatik fotosensitif oksipital lob epilepsisi
 - Vizüel sensitif epilepsiler
 - Primer okuma epilepsileri
 - İrkilme epilepsisi
- Otozomal Dominant nokturnal frontal lob epilepsisi
- Familial temporal lobe epilepsisi
- Febril konvülsiyonla giden jeneralize epilepsiler(FS+)
- Değişken odaklı familyal fokal epilepsi
- Semptomatik (veya muhtemelen semptomatik) fokal epilepsiler
 - Limbik epilepsiler
 - Mesial temporal lob epilepsisi hippocampal sklerozisle birlikte
 - Mesial temporal lob epilepsisi spesifik etyolojisi tanımlanmış
 - Neokortikal epilepsiler
 - Rasmussen Sendromu
 - Diğerleri

İnfantil spazm (IS) çocukluk çağında yaş ile ilgili olan özel bir epileptik sendrom tipi olup klasik olarak hayatın ilk iki yılında ortaya çıkar. En sık görüldüğü aylar 3-7 ay arasındır. %50-77 bu aylarda ortaya çıkar. EEG’de spesifik anormallikler (hipsaritmi), mental retardasyon ve myoklonik nöbetlerle karakterizedir. Bu triad bazen yukarıdaki tabloda da yer alan West Sendromu olarak da adlandırılır. İnsidansı 2,9- 4,5/10000 olup erkek çocuklarda biraz daha sıktır.

Etyolojide idiyopatik nedenlerin yanı sıra semptomatik nedenlerde önemli yer tutar. Bunların arasında hipoksik-iskemik ensefalopati, neonatal intrakranial kanama,

konjenital enfeksiyonlar, menenjit, ensefalit, santral sinir sisteminin kongenital anomalileri ve metabolik hastalıklar sayılabilir. Tuberoskleroz da sıklıkla IS'a eşlik eder (%4-25).

Genetik faktörlere bakıldığında infantil spazmlı vakaların %7-17'sinde ailevi febril konvülsiyon veya epilepsi hikâyesi alınmaktadır. Infantil spazmın familyal insidansının ise % 3-6 arasında değiştiği görülmektedir.

Hastalığın belirtileri;

- Başlangıç şekli ve yaşı
- Nöbet tipleri
- Psikomotor gerilik başlıkları altında toplanabilir.

Spazmlar sıklıkla hastalığın ilk belirtisi olarak ortaya çıkar. Bazen de ilk belirti mental gerilik şeklinde olabilir. Spazmlar ilk yıl içinde mental geriliğin en sık sebebidir. Çoğunlukla 3-7 ay arasında başlar.

Gelişimlerinde herhangi bir anormallik olmayan süt çocuklarında infantil spazmın başlamasıyla birlikte psikomotor gerileme görülebilir. Bu bozulma sıklıkla birkaç hafta içinde gelişebilir. Psikomotor gerilemenin olmaması, özellikle de göz kontağının korunması iyi gelecek için en iyi prognostik faktörlerden biridir.

Myoklonik epilepsi grubunda sınıflandırılan infantil spazm başlıca aksiyal (gövde) kasları etkileyen fleksiyon, ekstansiyon ve her iki tip kasılmayı bir arada gösterebilen spazmlarla karakterizedir. Kontraksiyonlar sıklıkla bağırma nadiren de gülmeyi izleyerek gelişirler.

Infantil spazmlar sıklıkla kümeler (cluster) tarzında gelirler. Küme içindeki her spazm bir nöbet olarak kabul edilir. Spazmlar vakaların % 25'inde bir yıldan daha kısa, % 50'sinde iki yıldan daha kısa sürerler. Bir yaşında vakaların % 28'inde, beş yaş civarında ise vakaların %72-93'ünde spazmların kaybolduğu görülür.

Spazmların dışında fokal veya generalize başta olmak üzere myoklonik, klonik, atonik ve akinetik ataklardan oluşan diğer nöbet tipleri hastaların %12-42'sinde spazmlara öncülük veya eşlik edebilirler.

Infantil spasmdaki klasik EEG bulgusu hipsaritmi olarak adlandırılır. Hipsaritmi yüksek voltajlı yavaş dalgalarla dikenlerin ve keskin dalgaların tüm kortikal alanlarda gelişigüzel görülmesidir.

Tedavide ACTH ve kortikosteroidler başlıca seçeneklerdir. Klasik antiepileptik ilaçlardan pek çoğunun infantil spazm tedavisinde etkinlikleri yoktur. Oldukça kötü bir prognoza sahiptir. Uzun dönem prognoza bakıldığında %20 gibi bir mortalite oranı vardır.

IS'ın X'e bağlı geçiş gösteren bir formu da tanımlanmıştır.(ISSX-2) Bu hastalıkta ARX (aristaless-related homeobox) geni ve CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5) geninde mutasyonlar tespit edilmiştir.

2.1.7. Dirençli Epilepsiler:

Epilepsi, sık rastlanılan ve hayat kalitesini bozan kronik, nörolojik bir hastalıktır. Antiepileptik tedaviye rağmen hastaların yaklaşık %30'u tedaviye direnç göstermektedir. Dirençli epilepsinin birçok nedeni bulunmaktadır (59). Tanımı kesin olmamakla birlikte nöbet sıklığı, şiddeti ve süresinin artması, en az ikili ilaç kullanımına rağmen ilaca cevabın azalması ve hasta yaşam kalitesinin nöbet nedeniyle etkilenmesi durumuna yol açan epilepsilerdir (60).

ILAE'nin üzerinde fikir birliği yaptığı ilaç dirençli epilepsi tanımı *''uygun AEİ seçimine rağmen sürekli nöbetsiz bir dönem elde edememe (ör; ya 12 ay tamamen nöbetsiz bir dönem veya 3 kez en uzun nöbet aralığı)''* şeklindedir (61).

En az ikili yeterli dozda ve gerekli zaman aralığında ilaç kullanımına rağmen nöbetleri yaşam kalitelerini etkileyen hastalar için dirençli epilepsi tanımı kullanılır. Dirençli epilepsi için değişik nedenler mevcuttur. Bunlar arasında yanlış tanı, doğru tanıli epilepsi nöbetine eklenen psödoseizures, yetersiz antiepileptik ilaç düzeyi, yaşam tarzı, antiepileptik ilaç toksisitesi sayılabilir (60). Tanı konulduktan sonra tek ilaç tedavisi ile hastaların yaklaşık %47'sinde nöbetler kontrol altına alınabilir. Kontrol edilemeyen nöbetlerde ikinci ilaç ilavesi ile bu oran %14'e iner. Yapılan çalışmalarda ikili veya üçlü ilaç tedavisi ile kontrol edilemeyen hastalarda tedaviye direnç yani medikal tedaviye cevap vermeyeceği büyük oranda belli olmaktadır.

2.1.7.1. Epilepside İlaç Direncinin Sebepleri

Epilepside ilaç direncinin sebepleri arasında;

- Nöbetlerin etyolojisi (progresif beyin lezyonları, metabolik hastalıklar, dirençli epileptik sendromlar)
- Tedavi öncesinde nöbet frekansı
- Başlangıç yaşının erken olması
- Yetersiz AEİ düzeyi
- AEİ toksisitesi
- Kan-Beyin Bariyeri'nin (KBB) ilaca geçirgenliğindeki değişkenlikler gibi etyolojik ve kimyasal nedenler sayılabilir.

Bir ilacın SSS'ne ulaşmasını kolaylaştıran etkenler arasında yüksek debili kan dolaşımı, ilacın lipit içeriğinin fazlalığı ve taşıyıcı moleküllerin işlevleri sayılabilir. KBB ve bu bariyerde hücre içinden dışına etkin taşınmada aktif transport görevi üstlenen moleküller, ilacın nöronlara ulaşmasını etkileyen nedenlerdendir (62).

Bazı epilepsi tiplerinde etyolojik olarak ilaca direnç saptanır. Etiyolojik bakımdan gelişimsel anormalliği olan dejeneratif ve metabolik nedenlere bağlı olarak (kortikal displaziler, MELAS, MERRF, Lafora, Gaucher vb. depo hastalıkları Unverrihcht-Lundeborg hastalığı ve Rasmussen ensefaliti gibi) ve West, Dravet, Ohtahara, Lennox-Gastaut, Mesial Temporal Skleroz, Landau Kleffner gibi epileptik sendromlarda ilaç direncine sıklıkla rastlanır(62).

Bazı genlerdeki mutasyonlarının sebep olduğu malformasyonel veya nonmalformasyonel sendromlar erken başlangıçlı dirençli epilepsi sebebi olabilmektedir. Bu genler arasında ARX (63,64), SCN1A(65), PCDH19 (66), STXBP1 (67), LIS1 ve DCX (68)ve CDKL5 (69,70)sayılabilir.

2.1.7.2. CDKL5 (Cyclin Dependent Kinase Like 5) Geni

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5, OMIM 300203) geni *STK9*, serine/threonine kinase 9 olarak ta bilinen, X' bağlı infantil spazmlılarda ciddi ensefalopati ile ilişkili bir gendir. (ISSX, OMIM 308350) (71-74). Bu gendeki mutasyonlar, erken infantil epileptik ensefalopati-2(EIEP-2-OMİM 300672), Rett Sendromu fenotipi ile benzeşen erken başlangıçlı şiddetli nöbetler ve X' bağlı infantil spazm sendromu ile ilişkilidir.(ISSX-2) (75). CDKL5 geni X kromozomunun p22.13 bölgesinde yerleşim

gösterir (Şekil 2). Bu bölge birçok hastalık ile ilgili kritik bir bölgedir. Keratosis follicularis spinulosa decalvans (KFSD, OMIM 308800), Nance-Horan sendromu (NH, OMIM 302350), X-linked dominant cone-rod degeneration (RP15), oral-facial- digital sendrom tip 1 (OFD1, OMIM 311200), craniofrontonasal sendrom (CFNS, OMIM 304110) ve nonsyndromic sensorineural deafness (DFN6) bunlardan en önemlileridir.

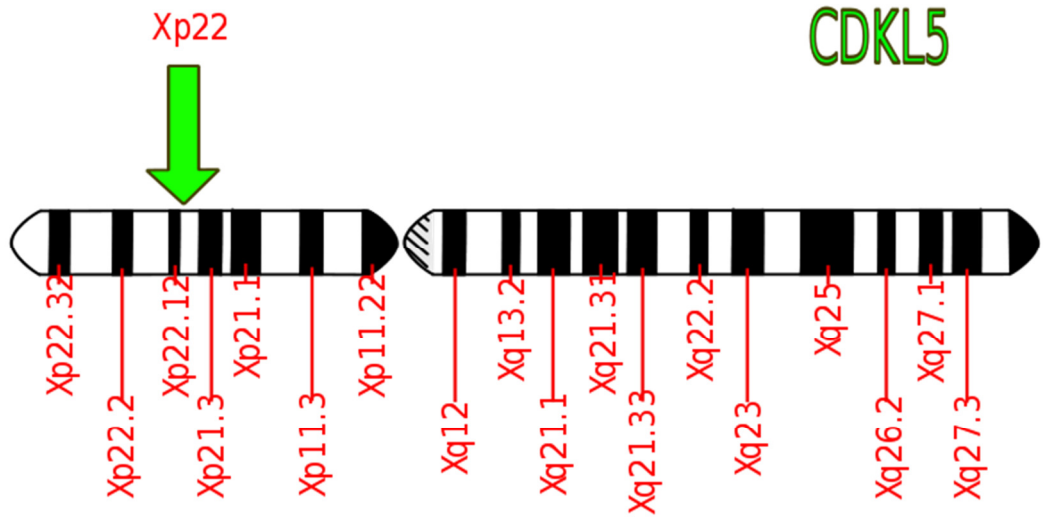
İlk defa 1998 yılında tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Ser / Thr protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve protein kinaz aktivitesi olan 1,022 -1,030 a.a büyüklüğünde, 118 kD ağırlığında bir fosforile proteini kodlar. 18.443.703 ile 18.671.749 arasında 228,047 baz uzunluğuna sahip olup 20 ekzondan oluşmaktadır (76). Yapılan sonraki çalışmalarda 23 ekzonlu olduğu ve ilk 3 ekzonun (1, 1a ve 1b) untranslated yani çevrilmeyen bölge olduğu ve muhtemelen 2 transkripsiyon başlangıç bölgesini temsil ettiği bildirilmiştir (71). Şekil 3

Fare beyrinde nöronal maturasyon ve sinaptogenesis sırasında Rett sendromu MECP2 (methyl CpG binding protein 2) geni ile örtüşen CDKL5 geninin ekspresyonu gösterilmiştir. Bu gen kinaz aktivitesine ve MECP2 genine benzer şekilde otofosforilasyona aracılık eden bir role sahiptir ki bu iki genin aynı moleküler yolu kullandığı düşünülmektedir.

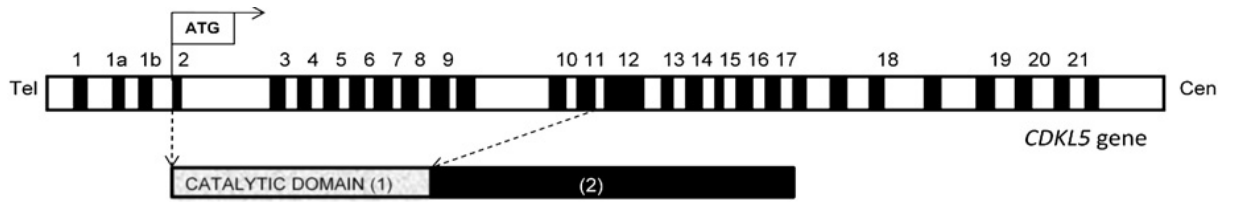
CDKL5 geni vücutta tüm dokularda özellikle beyin, timus ve testis’de eksprese edilir (70). Hücrelerde özellikle çekirdekte lokalizedir. Bu genin kodladığı proteinin faaliyetleri hakkında kısıtlı bilgiler olmasına rağmen diğer genlerin aktivitelerinde rol aldığı düşünülmektedir. Bu protein belirli pozisyonlardaki oksijen ve fosfat atomlarını ekleyerek diğer proteinlerin aktivitelerini değiştiren bir kinaz olarak görev alır. Henüz hangi proteinlerin bu proteinin hedefi olduğu belirlenememiştir.

Patojenik mutasyonlar proteinin N-terminal kısmındaki kinaz bölgesinde yoğunlaşmıştır.

Bu bölgenin mutasyonları C-terminal bölgesindeki mutasyonlardan daha fazla dirençli nöbetler ile ilişkili bulunmuştur (77). Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte C-terminal alanının çıkarılması ekspresyonun artışına, otofosforilasyon aktivitesinin gelişmesine ve perinükleer lokalizasyona neden olmasından dolayı, C terminalin de CDKL5 fonksiyonunu düzenleyici olabileceği düşünülmektedir (78). Şekilde genin kinaz bölgesi ve uzunca bir C-terminal bölgesi görülmektedir. Şekil 4



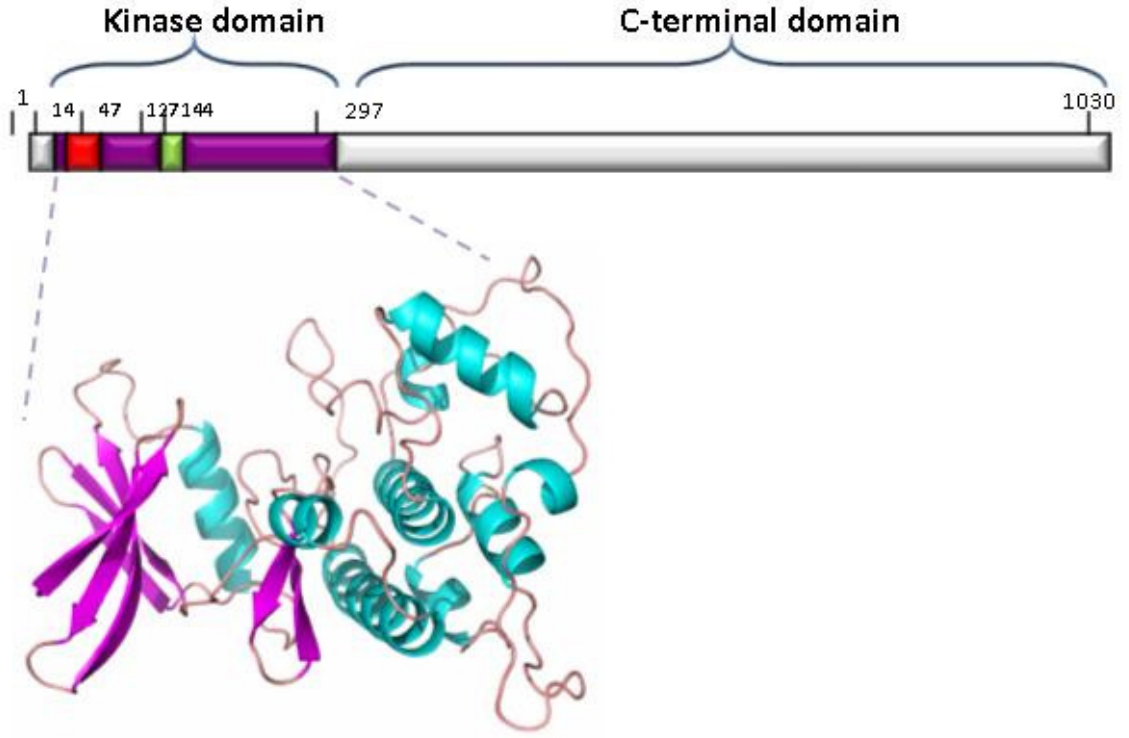
Şekil 3: X kromozomu, CDKL5 geninin genomik lokalizasyonu.



Şekil 4: Ekzonlar, CDKL5 geninin şematik sunumu. Toplam 23 ekzon, ilk 3 ekzon untranslated region(UTR)



Şekil 5: UTR: Untranslated (çevrilmeyen) bölgeler.



Şekil 6: CDKL5 geninin kodladığı protein.

14-47:ATP binding domain

127-144: Serin/threonin kinaz domain

CDKL5 gen mutasyonlarında infantlarda erken başlangıçlı dirençli epilepsi, çeşitli derecelerde gelişme geriliği ve Rett Sendromu benzeri klinik bulgular ortaya çıkabilir. Rett Sendromunun atipik formu (EIEE-2) ve ISSX-2' de CDKL5 geninde mutasyonlar saptanmıştır. EIEE2 Rett Sendromuna benzemekle birlikte nöbetler infantil dönemde başlamaktadır. ISSX-2' de nöbetler infantil dönemde görülür ayrıca zihinsel yetersizlikler ve beyin anormallikleri vardır.

Bugüne kadar bildirilenlerin arasında; ISSX-2'li birbiri ile ilişkisiz 2 kız çocuğunda dengeli t(X;7)(p22.3;p15) ve t(X;6)(p22.3;q14) de novo translokasyonları sonucunda CDKL5'in fonksiyon bozukluğu (71), atipik Rett sendromunun fenotipik bulgularını taşıyan ve ISSX-2'li etkilenmiş aile bireylerinde yapılan çalışmalarda CDKL5 mutasyonu (72), yine atipik Rett'li hastalarda 2 ilave yeni mutasyon (79), Rett sendromlu 16 hastada MECP2 geninde olmayan fakat aynı anda CDKL5 geni exon 5'de bulunan mutasyon vardır (78). Ayrıca Archer (2006), Van Esch (2007), Elia (2008),

Erez (2009), Nemos (2009) tarafından bildirilmiş mutasyonlarda literatürde yer almaktadır.

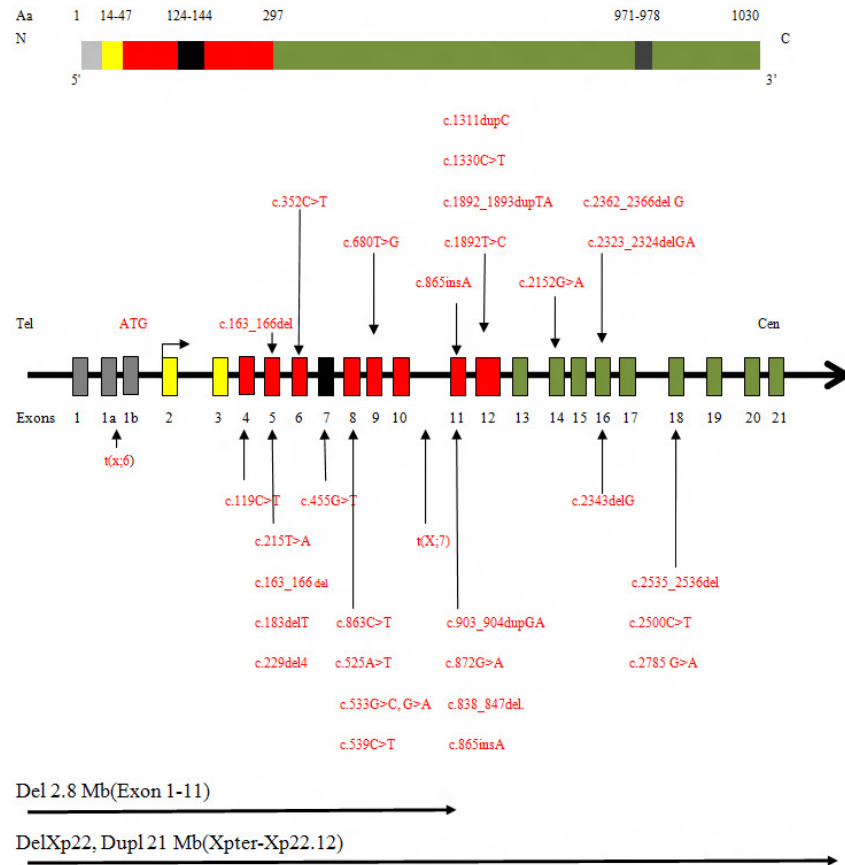
CDKL5 mutasyonları ılımlı epilepsi, epilepsi olmadan otizm ve Angelman benzeri fenotip gibi farklı fenotiplerle ilişkilidir (80). Mutasyonlar sıklıkla kızlarda olmakla birlikte erkeklerde de bazı mutasyonlar tespit edilmiştir. Fakat epileptik ensefalopatili erkeklerde mutasyon sıklığı nadirdir. Erkeklerde mutasyonlar şiddetli veya ciddi zekâ geriliği ve erken başlangıçlı dirençli nöbetleri ile daha çok ilişkilidir. Erken başlangıçlı nöbeti olan kız çocuklarında CDKL5 geninde mutasyon sıklığı tahminen %9 iken, erken başlangıçlı nöbet ve infantil spazmlı kız çocuklarında ise bu oran %28'dir (7). Çoğu mutasyon tek vaka şeklinde iken bazı tekrarlayan mutasyonlarda tespit edilmiştir. CDKL5 proteinin fonksiyonel bölgesindeki mutasyonlara bağlı oluşan çeşitli düzensizlikler hastalığın patogenezi hakkında ipuçları vererek, epileptik fenotipi desteklerler. Yapılan bir çalışmada CDKL5 genini içeren delesyona ve aynı zamanda EIEE-2 fenotipine sahip hastada, CDKL5 geni ürünü proteininin eksikliğinin letal olmadığı fakat ciddi nörolojik gelişim geriliğine ve erken başlangıçlı epilepsiye sebep olduğu tespit edilmiştir (75).

2.1.7.3. CDKL5 Gen Mutasyonları

CDKL5 geni moleküler etyolojisi infantil spazm, Atipik Rett Sendromu ve özellikle erken başlangıçlı dirençli nöbetlerde ortaya konmuştur. Bu gendeki mutasyonları taşıyan hastalarda mental retardasyon, otistik bulgular, Rett sendromu benzeri bulgular ve özellikle erken başlangıçlı nöbet bulguları dikkati çekmektedir (7). CDKL5 geninde günümüze kadar yapılan çalışmalarda çoğunluğu missense, nonsense, delesyon, insersiyon ve kompleks yeniden düzenlenmeler olmak üzere 90 civarında mutasyona rastlanmış olup bunların patojenik olanları 40 civarındadır.

Tablo 3: CDKL5 geninde tespit edilen toplam mutasyon sayıları. (Patojenik ve nonpatojenik)

Mutasyon Tipi	Toplam Mutasyon Sayısı
Missense	34
Küçük Delesyon	15
Küçük İnsersiyon	6
Büyük Delesyon	17
Büyük İnsersiyon	2
Küçük indel	2
Splicing	13
Kompleks rearregement	4



Şekil 7: CDKL5 geninde sık görülen mutasyonlar

Yapılan çalışmalarda CDKL5 geni üzerinde saptanan mutasyonlar arasında en sık rastlanılanlar; c.119C>T (rs122460159) (69,77), c.215T>C (rs62641235) (81), c.455G>T (rs122460157) (72), c.525A>T (rs61749700) (72), c.533G>A (rs61753169) (82), c.539C>T (rs61749704) (83), c.1330 C>T (rs61753977) (81), c.2535_2536del (rs61753251) (69,77,81) sayılabilir.

2.2. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI (OSB):

Otistik Spektrum Bozuklukları (OSB) tipik olarak hayatın ilk yıllarında başlayan sosyal, iletişimsel ve bilişsel gelişimde gecikme, duraklama ve sapmanın görüldüğü nöropsikiyatrik bozukluklar grubunu tanımlar (84). Genel olarak bu bozukluklar birçok alanı etkilerler ve devamlı işlev bozukluklarına yol açarlar.

OSB Ruhsal Bozukluklar İçin Tanı ve İstatistik El Kitabı'nın Gözden Geçirilmiş Dördüncü Baskısı'nda (DSM-IV-TR), otistik bozukluğu (OB), Rett Bozukluğunu (RB), Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğunu (ÇDB), Asperger Bozukluğunu (AB) ve Başka Türli Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozuklukları (BTA-YGB) içerir (85).

2.2.1. Otistik Bozukluk:

Klinik olarak heterojen bir grup hastalık olan OSB (Pervasive developmental disorder-yaygın gelişimsel bozukluk) içinde yer alan, belirtileri yaşamın ilk 3 yılı içinde başlayan, etkileşim ve iletişim alanında belirgin gecikme ve sapmalar ve kısıtlayıcı ilgi alanı ile karakterize bir bozukluktur. DSM-IV' de yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) grubunda yer alan 5 bozukluktan birisidir (85).

İlk defa 1943 yılında Leo Kanner 11 hastalık olgu sunumu yaparak "infantil otizm" adı ile bu hastalıktan söz etmiştir (86). İlk kez 1980 yılında psikiyatrik sınıflama sistemleri içinde yerini almıştır (DSM-III). Başlangıçta 6 olan ölçüt sayısı DSM-III-R'de 16 olmuş, bunlardan 8'inin yeterli olduğu ve başlangıç yaşı ile ilgili sınır varlığı belirtilmemiştir. (DSM-III' de sınır 30 aydan önce idi) DSM-IV' de ise sosyal etkileşimde bariz yetersizlik, iletişimde kalitatif yetersizlik ve tekrarlayıcı ilgi alanı ile aşırı uğraş başlıkları altında 12 belirti sıralanmıştır, ICD-10'da ise bunlara yakın belirtiler söz konusudur (87).DSM-IV-TR OB için tanı ölçütleri aşağıda verilmiştir.

DSM-IV-TR OB için tanı ölçütleri (85).

A. En az ikisi (1)'inci maddeden ve birer tanesi (2) ve (3)'üncü maddelerden olmak üzere

(1) Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren toplumsal etkileşimde nitel bozulma:

(a) Toplumsal etkileşim sağlamak için yapılan el-kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi sözel olmayan birçok davranışta belirgin bir bozulmanın olması.

(b) Yaşıtlarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememe.

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

(d) Toplumsal ya da duygusal karşılıklar verememe.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(d) Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma

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

(1) Toplumsal etkileşim,

(2) Toplumsal iletişimde kullanılan dil ya da

(3) Sembolik ya da imgesel oyun

C. Bu bozukluk RB ya da ÇDB ile daha iyi açıklanamaz

2.2.1.1. Epidemiyoloji:

OB ile ilgili ilk epidemiyolojik çalışma, 1966 yılında İngiltere’de 8-10 yaş arasındaki çocuklar arasında yapılmış, prevalans 4.5/10,000 olarak bulunmuştur (88). Bu çalışmanın ardından günümüze kadar OB ve YGB ile ilgili 40’den fazla epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. 2009’da yayınlanan gözden geçirme çalışmasında, OB ortalama prevalansı 20.6/10,000 otizm spektrum bozuklukları ortalama prevalansı 60-70.10.000 (yaklaşık 1/150) olarak bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda OSB insidansında artış göze çarpmaktadır (89-91).

OB erkeklerde artmış sıklıkta görülür. Erkek / kız oranı 3,5-4/1 olarak belirlenmiştir.

Dikkat çekici bir bulgu zekâ geriliği şiddetlendiğinde erkek/kız oranı 1’e yaklaşmaktadır. OB’nin erkeklerde daha sık görülüyor olmasının nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Olasılıklardan biri beyin incinebilirliği açısından erkeklerde eşiğin daha düşük olması ve bu nedenle bozukluğun erkeklerde daha sık izleniyor olmasıdır. Beyin incinmesi şiddetlendiğinde kızların da bu bozulmadan kendilerini kurtaramadığı öne sürülmektedir. OB’nin görülme riski açısından sosyal sınıflar arasında farklılık gözlenmemektedir (92).

Diğer YGB’ler OB’den daha nadirdir. ÇDB sıklığı 2/100000 olarak bildirilmiştir (89). RB benzer şekilde nadirdir (93). Özellikle kızları etkileyen RB dışındaki tüm YGB’ler erkeklerde daha sıktır (89-93).

OB olan çocukların %30’unda normal zekâ düzeyi, %30’unda hafif-orta derecede zekâ geriliği ve %40’ında ağır-ileri düzeyde zekâ geriliği saptanmıştır (94).

2.2.1.2. Etiyoloji

Otizm spektrum bozukluklarının (OSB) etiolojisi halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Çok sayıdaki araştırmalara rağmen, halen yaygın gelişimsel bozuklukların etioloji ve gelişimi ile ilgili tutarlı bir model oluşturulamamıştır. İlk zamanlar psikodinamik ve ailesel etmenlerle nedenler açıklanmış ancak yapılan araştırmalarla net olarak doğrulanamamıştır. Otizme sıklıkla zekâ geriliğinin eşlik etmesi, epileptik bozuklukların ve EEG anormalliklerinin sıklığının yüksek olması, diğer tıbbi durumlar ile birlikte görülmesi, elektroensefalografik, genetik, otopsi ve nörokimyasal çalışmalarda da anormalliklerin bulunması daha çok biyolojik bir bozukluk olduğunu düşündürmüştür (95).Günümüzde OSB'nın etiolojisinde çok çeşitli etkenler suçlanmaktadır.

1. Psikodinamik ve Ailesel Etkenler

Başlangıçta Kanner'in hastalıkta duygusal etkenlerin rol oynayabileceği öngörüsü daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda desteklenmemiştir. Son yıllarda otistik çocukların ailelelerinde normal popülasyona göre daha fazla oranda sosyal güçlükler, duygudurum ve anksiyete bozuklukları olduğu saptanmıştır (96).

2. Çevresel Etkenler

Otistik bozukluğu olan çocukların doğum öyküleri incelendiğinde genel popülasyona kıyasla bu hastalarda gebelik ve doğum sırasında meydana gelmiş olan komplikasyonların daha sık olduğu görülür.

3. Biyokimyasal Etkenler

Hastaların en az üçte birinde plazma serotonin düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur (97-99). Otistik hastalarda plazma oksitosin düzeyi düşük olarak bulunmuştur (100). Otistik hastaların beyinlerinde sorunlu olduğu düşünülen bölgelerin glutamattan zengin olduğu ve glutamat antagonistleri ile otistik semptomların açığa çıktığı belirtilmektedir (101).

4. Nöroanatomik Etkenler

Otistik hastalarda bugüne kadar birçok yapısal ve fonksiyonel görüntüleme çalışması yapılmıştır. Çalışmaların herbiri bu hastalarda bir dizi beyin anormalliğini göstermektedir fakat sonuçlar birbiri ile kıyaslandığında eldeki bulguların tutarlı olmadığı görülmektedir

5. İmmunolojik Etkenler

Otizimde immün sistem ile ilgili sorunlar olabileceği bildirilmiştir (102-103).

6. Endokrin Sistem Değişiklikleri

Nir ve arkadaşları (1995), otistik çocukların bazı alt gruplarında, hipotalamopitüiter aksın (HPA) sirkadiyen kontrolünde disfonksiyon olabileceğini belirtmişler ve melatonin salınımının işlevsel ritmindeki bozukluğun da otizmdeki serotonin sistemi ile ilgili sorunlarla bağlantılı olabileceğini öne sürmüşlerdir (104).

7. Genetik Etkenler

Otizmin tanımlanmasından üzerinden uzunca bir süre geçmesine ve gittikçe artan bilgilere rağmen halen etyopatogenezi açıklığa kavuşmuş değildir. Son yıllarda genetik etkenlerin rolü üzerinde çalışmalar sıklaşmıştır. Kanner (1943) otizmin doğuştan gelen yapısal bir bozukluktan kaynaklandığını belirtmiştir (86).

Otizmin etyolojisinde genetik ve çevresel etmenlerin her ikisinin de önemli olduğunun bilinmesine karşın, bu hastaların ailelerinde otistik özelliklerin az olması ve otozomal resesif bir geçiş örüntüsü göstermemesi nedeniyle genetik etmenlerin önemi uzun yıllar boyunca göz ardı edilmiştir (105). Aile ve ikiz çalışmaları, genetik etyolojinin otizmdeki önemini gözler önüne sermektedir (106). Otizmlili bireylerin kardeşlerinde bu hastalığın görülme olasılığı %3 olarak bildirilmekte iken (107) yapılan bir çalışmada monozigot ikizler arasında otizm konkordansı %36 bulunmuş, dizigot ikizler arasında anlamlı bir konkordans saptanmamıştır (108). Aynı çalışmada daha geniş bir otizm fenotipi temel alınarak analizler yapıldığında monozigot ikizler arası konkordans %82 iken, dizigot ikizlerde %10 olarak bulunmuştur (109). Kalıtım şekli, tek gene bağlı Mendel kalıtımına uygun değildir (110). Tek yumurta ikizlerinden bir tanesinde otizm olması halinde diğerinin de otistik olma olasılığının, çift yumurta ikizlerine oranla yüksek olması, otizmin etyolojisinde genetik bileşenin ne kadar önemli olduğu lehine yorumlanabilir. Bu durum, genetik yatkınlığın hastalığın ortaya çıkmasında çok önemli bir etken olabilecek iken bazı durumlarda da yeterli olmadığını gösterir niteliktedir ki bu da çevresel etkenleri akla getirmektedir.

Günümüzde genetik etkenler %10-20 arasında etkilidir (111). OSB'nin bilinen genetik nedenleri arasında;

1. Sitogenetik olarak görülebilen kromozomal anormallikler : %5
2. Gen kopya sayısı varyantı (Copy number variations-CNVs); submikroskopik delesyon ve dublikasyonlar :%10–20
3. Nörolojik bulguları OSB ile ilişkili tek gen hastalıkları :%5

Yüksek rezolüsyonlu kromozom analizinde OSB’li çocukların yaklaşık %5’inde kromozomal anöploidi bulunmuştur. Diğer %3-5’lik kısmın tespitinde ise Floresan İnSitu Hibridizasyon (FISH) tekniği kullanılmıştır. Beklenildiği gibi dengesiz kromozomal anormallikler dismorfolojik bulguların eşlik ettiği otizmli çocuklarda daha sık bulunmuştur (112,113).

Pek çok kromozom anormalliğine otizmin de eşlik ettiği bildirilmiştir ki bunlarda sıklıkla delesyonlardır. Kromozom 14 ve 20 dışında tüm kromozomlarda çeşitli anormallikler bulunmuştur. Bu değişiklikler en sık 15 nolu kromozomda ve X kromozomundadır (114). Kromozom anormallikleri için 3 önemli alan vardır. Bunlar: 15q11-q13,22q ve X kromozomudur (115). Otistik bozukluklar için özellikle kromozom 2, 4, 7 (7q31–35), 10, 16, 1, 19 ve 22 olmak üzere 7 gen lokusunun öne çıktığı görülmektedir. Aile içi görülme sıklığı değişik kaynaklarda farklılıklar göstermektedir ki genel topluma oranla 60–100 kat fazla olduğu, monozigotik ikizlerde 36–96 kat fazla ve dizigotik ikizlerde 0-24 kat fazla olduğu belirtilmektedir (116).

Prader-Willi/Angelman sendromu kritik bölgesi (15q11-q13) otizmli çocuklarda en sık görülen kromozomal anomalidir ve %1-3 oranında rastlanır. Down sendromlu çocuklarda da otizm sıklığı normalden fazla bulunmuştur (117).

Gen kopya sayısı varyantı (Copy number variations-CNVs), a CGH otistik çocuklarda yüksek çözünürlüklü kromozom analizi ve FISH’in yerini almaktadır. Tüm genom üzerinde bilinen delesyon/dublikasyon sendromlarının test edilmesinde ve subtelomerik bölgelerin değerlendirilmesinde aCGH’a klinik olarak uygun platformlar tasarlanmıştır. Bu platformlar moleküler markerlerin çeşitli yoğunluk ve tiplerinde kullanılmıştır ve bunlar tanımlanmış yeni CNV hot spotları gibi sürekli geliştirilmektedir.

Son çalışmalarda idiopatik otizmli vakaların %7-10’unda klinik olarak ilişkilendirilmiş de novo genomik dengesizlik tespit edilmiştir ki bu sendromik otizm tanısını koyanlara bu vakalarda artı bir kazanç sağlamıştır (118,119).

Otistik ve dismorfolojik bulguları olan, daha önceden rutin sitogenetik çalışmalarda normal karyotip saptanan bireylerde 1 Mb genişliğinde genomik array kullanılarak %27,5 oranında klinikle ilişkili CNV's tespit edilmiştir (113).

Oligonükleotid array kullanılarak ailede tek otizmlili vakalarda %10, multiple vakalı ailelerde ise %2 oranında de novo kopya sayı değişiklikleri tespit edilmiştir (118). Marshall ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise %44 oranında dengesiz CNVs tespit edilmiştir (120). 550.000 SNP marker kullanılarak yapılan OSB'lu ve sağlıklı Avrupa kökenli çocuklarda tüm genom çalışmasında, nöronal hücre adezyon kuvvet moleküllerini kodlayan genlerde (NRXN1, CNTN4, NLGN1 ve ASTN2) ve ubiquitin yoluyla ilgili genlerde (UBE3A, PARK2, RFWD2 ve FBXO40) çeşitli patojenik genomik değişiklikler tespit edilmiştir (121).

Otizmle ilgili bazı CNVs'ler şunlardır:

- 16q11.2 Delesyon Sendromu; gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik ve/veya OSB ile karakterizedir. Otizmlili vakalarda %1, gelişme veya dil gerilikli vakalarda %1,5 oranında tespit edilmiştir (122). Sıklıkla de novo şekilde görülür fakat otozomal dominant kalıtım ile de geçiş bulunmaktadır.
- 15q13.3 Delesyon Sendromu; entelektüel yetersizlik, epilepsi, OSB ile karakterize, klinik olarak değişken bir sendromdur (123,124).

2.2.2. Sendromik Otizm

Tek gen hastalıklarında aşağıda yer alan durumların yaygın sendromik otizme neden olduğu bilinmektedir. Bunlar:

1. Fragil X sendromu (FSX); Xq27.3 bölgesinde lokalize FMR1 geninin 5' ucundaki anormal CGG üçlü nükleotid tekrarı neticesinde meydana gelir. 5-45 tekrar sayısı normal, 45-54 tekrar intermediate, 55-199 tekrar premutasyon ve 200 tekrar üzerinde tam mutasyon olarak tanımlanır. Kalıtsal mental retardasyonun (MR) en sık sebebidir. X'e bağlı MR (XLMR) erkeklerdeki MR'nin %25'ini oluştururken Fragil X sendromu XLMR'nin %40'ını teşkil etmektedir (125).

Fragil X sendromlu erkeklerin otizm sıklığı 1,5–3,3/100 arasında değişmektedir. Otizm semptomlarının varlığı ve ciddiyeti, Fragil X sendromlu erkeklerin davranışsal fenotiplerindeki değişkenliğin önemli kaynaklarıdır (128,127). Fragil X Sendromundaki

otistik bulgular başlıca perseverasyon, motor stereotipiler, tekrarlayıcı konuşmalar ve zayıf göz temasıdır (128,129).

Moleküler çalışmalar FMR1 geninin iki mekanizma ile otizm fenotipine neden olabileceğini göstermektedir. İlki nöronlar için RNA toksisitesi ve ikincisi ise nöronal bağlantıyı etkileyen gen susturulmasıdır (130,131). Çocukluk otizmi derecelendirme ölçeğine göre, FMRP (Familyal Mental Retardasyon Proteini) düzeyi ile otistik davranışların düzeyi arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (132-133).

2. Rett Sendromu: Rett Sendromu (MIM: 312750) kızlarda Down Sendromundan sonra ikinci sıklıkta kognitif bozukluğa yol açan, postnatal nörolojik gelişim bozukluğu ile giden X'e bağlı dominant bir hastalıktır. Methyl-CpG Binding Protein 2 (MeCP2) genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkan bir grup hastalık içerisinde sınıflandırılabilir. Klasik Rett, varyant Rett ve hafif öğrenme güçlüğü şeklinde. MeCP2 mutasyonu erkeklerde letal kabul edilmektedir. %99'u de novo mutasyonlara bağlı basit vakalardır.

Klasik Rett Sendromlu hastalar ilk 6-18 aylık dönemde normal gelişim gösterirken 1-4 yaş arasında gelişimsel duraklama dönemine girerler. Sosyal geri çekilme, konuşmanın kaybı, irritabilite ve istismar edici davranışlar sergilerler. Diğer otistik bulgular ifadesiz yüz, sese aşırı duyarlılık, göz teması eksikliği, çevreye ilgisizliktir. 4-7 yaşta bu bulgular stabilize olabilir yine de bariz kognitif ve motor bozukluk ve sıklıkla epilepsi gelişir. 5-15 yaş arası nöbetler daha az sıklıkta olmasına rağmen motor gerileme devam eder.

5 adet RTT Sendromu varyantı veya atipik formu tariflenmiştir.

1. Kızlarda 6. aydan önce görülen nöbetlerin hâkim olduğu klasik RTT Sendromu fenotipi. Hanefeld tarafından 1985 yılında ilk kez tariflenmiştir. Burada MeCP2 mutasyonu negatif olmakla birlikte CDKL5 mutasyonlu vakalar vardır. Hanefeld varyantı bulguları X'e Bağlı İnfantil Spazm Sendromu bulguları ile örtüşebilmektedir.
2. Konjenital veya prekoks Rett: Regresyon açık değildir fakat klinik bulgular Rett ile örtüşür. MeCP2 mutasyonu negatif FOXG1 mutasyonu pozitif vakalar vardır.
3. Regresyonun klasik formdan daha yavaş ve geç geliştiği form.
4. Forme Fruste RTT Sendromu. Bulguların hafif, inkomplet ve daha geç ortaya çıktığı form.

5. Preserved Speech Variant (PSV-Zappella varyant). Konuşmanın klasik forma nazaran daha iyi olduğu formdur.

Bu formlar daha önceden klinik olarak şüphelenilen fakat moleküler tanısı konmayan Angelman Sendromlularında, spastisite veya tremor ile birlikte öğrenme güçlüğü olanlarda, hafif öğrenme güçlüğü çekenlerde ve nadiren otizmlilerde daha artan sıklıkta tanı almaya başlamıştır. Klasik Rett Sendromundan farklı olarak daha hafif veya şiddetli olabilirler. Şiddetli formlarında normal gelişim periyodu yoktur ve erken dönemde hipotoni ve infantil spazm görülür. Hafif formlarında ise dramatik bir regresyon ve entelektüel yetersizlik vardır.

3. Prader–Willi ve Angelman Sendromu: 15q11-13 bölgelerindeki 4 Mb’lik delesyon sonucu oluşan 2 farklı klinik tabloyu tanımlamaktadırlar. Paternal orjinli delesyon Prader-Willi (PWS), maternal orjinli delesyon ise Angelman Sendromuna (AS) neden olmaktadır. PWS (MIM:176270) 1/ 15 000 doğumda görülmekte ve tipik olarak neonatal hipotoni ve yutma güçlüğü ile karakterizedir. Ayrıca hipogonadizm, karakteristik yüz, küçük el ve ayaklar ile hipopigmentasyonda bulunabilmektedir. Son yapılan çalışmalarda PWS tanısı alan 25/100 hastanın tekrarlayıcı davranışlar sergilediği ve OSB’yi andıran sosyal defektler gösterdiği görülmüştür (134,135).

Angelman sendromu (MIM: 105830) 1/5 000 doğumda görülen PWS’den farklı olarak mikrosefali, hareket bozukluğu, karakteristik mutlu kişilik yapısı, nöbet, çok az konuşma veya hiç konuşmama ile birlikte olan ciddi öğrenme güçlüğü ve hipopigmentasyon bulguları ile tanımlanır. AS’de görülen OB’lar komorbid olarak kabul edilmektedir.

4. Down Sendromu (DS): Down Sendromu(DS) 1/750 doğumda görülen, öğrenme güçlüğüünün en yaygın sebebi ve belirgin fenotipik bulgularla karakterize kromozomal bir hastalıktır. DS’da OSB’nin sıklığı 1/100 ile 11/100 arasında bildirilmiştir. Genel populasyona oranla otizm yaklaşık olarak 10 kat daha fazla görülür. Otizm ve Down sendromu birlikteliği sıklıkla kadın hastalarda görülmekle beraber erkeklerde bu oran daha azdır (136).

Yapılan bir çalışmada DS ile birlikte OSB olan çocuklarda OSB olmayanlara oranla daha fazla beyinde fonksiyon bozukluğuna rastlandığı bildirilmiştir (137).

5. Turner Sendromu(TS): Tek X kromozomu veya bunun varyantları şeklinde ortaya çıkan sayısal bir kromozom anomalisidir.1/2000-5000 doğumda görülür. TS’da önemli ölçüde artmış bir OSB riskinden bahsedilmektedir (138).

6. Klinefelter Sendromu(KS): 1/575 ile 1000 canlı doğumda görülen, XXY karyotipe sahip, erkeklerde en sık hipogonadizm ve infertiliteye neden kromozomal bir hastalıktır. OSB’lilerde yapılan genetik çalışmalar XXY paterninin OSB ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca normal erkeklere oranla toplumda artan düzeyde otistik bulgular gösterdikleri de belirtilmiştir.

7. PTEN Makrosefali Sendromu; PTEN geni geniş bir hastalık grubu ile ilişkisi bulunan tümör supresör gendir. Son yıllarda PTEN gen mutasyonunun otizm ve makrosefali ile ilişkisini gösteren yayınlar mevcuttur (139,140). Buna bağlı olarak, PTEN geninin nöronal hayatta kalma ve sinaptik plastisite dâhil olmak üzere, beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. OSB nedeni olarak PTEN mutasyon sıklığı net olarak bilinmemekle beraber bu mutasyon OSB için spesifik değildir.

8. Sotos Sendromu; Aşırı büyüme sendromlarında birisidir. Bu sendromun başlıca bulguları makrosefali, tipik yüz görünümü, (belirgin alın, aşağı dönük palpebral fissürler, sivri çene, gibi) aşırı büyüme ve hafiften ciddiye kadar olan öğrenme güçlüğüdür. NSD1 genindeki mutasyon sonucu meydana gelir. Davranış problemleri, konjenital kalp hastalıkları, yenidoğan sarılığı, skolyoz ve nöbetler başlıca bulgulardır. Davranış problemleri görülse de Sotos sendromu klasik otizmin önemli nedenleri arasında yer almamaktadır.

Diğer bazı aşırı büyüme sendromlarında da OSB bulguları görülebilmektedir. Bunlar arasında Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), Perlman (PS) ve Beckwith-Wiedemann sendromları (BWS) sayılabilir. BWS’da %6.8 oranında OSB bulguları bildirilmiştir (141).

9. Tüberoskleroz Kompleksi (TSC); Tüberoskleroz kompleksi TSC1 veya TSC2 genindeki mutasyon sonucu oluşan O.D kalıtmı bir hastalıktır. OSB’yi içeren gelişimsel veya davranışsal bozukluklar TSC’ de sık karşılaşılabilen durumlardır. Genel popülasyona nazaran OSB TSC’li hastalarda daha sıktır (%17-63 arasında) (142,143). Ancak bu birlikteliğin patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. TSC ve OSB birlikteliğinin cinsiyet açısından farkı yoktur. Yani kız ve erkeklerde oranları eşittir.

10. Nörofibromatozis 1 (NF1); Otizmli çocuklarda NF1 tanısı konmuş olmasına rağmen çocukluk çağında sık karşılaşılan bu iki durumun birbiri ile ilişkisi tam olarak ortaya konmuş değildir (144).

11. Joubert Sendromu (JS); Serebellar vermisin komple veya parsiyel agenezi, anormal solunum, anormal göz hareketleri, kognitif yetersizlik ve davranış problemleri ile karakterizedir. Sosyal davranış bozuklukları, dil problemleri, tekrarlayıcı davranışlar gibi OSB bulguları JS'lilerin %40 kadarında görülebilmektedir ve %25 kadarı da DSM-4 'e göre otistik bozukluk kriterlerini karşılamaktadır (145-148).

12. Mitokondrial Hastalıklar; Mitokondriyal solunum zinciri bozuklukları sadece nadir durumlarda otistik kişilerde bildirilmiş olmasına rağmen, laktat plazma konsantrasyonları artışı sık not edilmiştir (149).

13. Fenilketonüri (FKU); Fenilalaninhidroksilaz (PAH) genindeki mutasyon sonucu meydana gelen hereditör bir hastalıktır. Sıklıkla otistik belirtilerle ilişkili bulunmuş olmakla beraber erken dönemde tarama ve tedavi neticesinde bu ilişki azalmaktadır. Yinede tarama testlerinin yapılamadığı yerlerde, hastane dışı doğumlarda ve yanlış negatiflik gibi gözden kaçan durumlar neticesinde otistik davranış bozuklukları ve diğer nörolojik bulgularla başvurulara rastlanmaktadır (150).

14. Adenilosüksinat Liyaz Defekti; Pürin sentezindeki defekt sonucu vücut sıvılarında süksinilpürin birikimine neden olan nadir bir durumdur. Otizm semptomları göz temasında zayıflık, tekrarlayıcı davranışlar, saldırganlık, nöbetleridir (151).

15. Kreatin Defekt Sendromları; Yenidoğanda kreatin metabolizması bozuklukları iki kreatin biyosentez hastalığını içerir.İlki guanidinoastat metiltransferaz (GAMT) defekti, ikincisi ise L-arginin glisin amidinotransferaz defektidir. İntellektüel yetersizlik ve nöbet sık görülürken GAMT defektiinde davranış problemleri ve otizm %80'e yakın oranda görülmektedir.

16. Smith-Lemli-Opitz Sendromu; Multiple konjenital anomali ve entelektüel yetersizlikle giden, kolesterol biyosentezindeki bir enzim defekti sonucu oluşan O.R hastalıktır. Otistik davranışlar %50-86 oranında rapor edilmiştir (152).

Tablo 4: Diğer sendromik otizm nedeni olan hastalıklar.

Cole Hughes Makrosefali Sendromu
San Filippo Sendromu
Cornelia de Lange Sendromu
Williams Sendromu ve resiprokal 7q11.23 microduplikasyon Sendromu
17p11.2p11.2 dublikasyon Sendromu
22q11.1 delesyon Sendromu
WAGR Sendromu
Duchenne muscular distrofisi

Sık görülen etyolojisi bilinmeyen gelişimsel sendromlardan;

Moebius Sendromu veya sekansı unilateral veya bilateral altıncı ve yedinci kranial sinir felci neticesinde gülümseme ve göz hareketlerinde bozuklukla karakterizedir. Bu hastaların %30'unda OSB bulgular görülmektedir (153).

Landau-Kleffner Syndrome (LKS) nadir görülen epileptiform bir anomali olup ani afazi, epilepsi ve EEG bozukluğu ile karakterizedir. OSB'li çocukların küçük bir grubunu oluştururlar.

2.2.3. Nonsendromik Otizm

Birçok çevresel ve genetik etkenler otizm etyolojisine katkıda bulunurken çoğu zaman bu genleri belirlemek oldukça zordur. OSB'li hastanın akrabaları arasında otizm riskinin azaldığının tespit edilmesi önemlidir, ayrıca her birinin etkisi az olmakla birlikte 100'e yakın allel tespit edilmiştir ki bunlar otistik fenotipin kökenini oluşturabilirler. Bu bilgiler ışığında tanımlanan lokusların bazılarının veya tamamının fenotipe katkısı bulunduğu tespit edilmiştir (154). Her bir otozomal lokus AUTS, gonozomal lokuslar ise AUTSX olarak adlandırılır.

Bazı otizm lokusları aynı zamanda öğrenme güçlüğü lokusları ile ortaktır. Bulunan bu yapısal gen varyantları OSB'li hastalarda rutin sitogenetik ve microarray çalışmalarının yapılmasını gündeme getirmiştir. Fakat bu genler bütün çocuklarda otizm gelişimine

neden olmamakla beraber majör bir predispozan faktör olarak belirlenmişlerdir. Non sendromik otizmden sorumlu olduğu düşünülen bazı aday genler tabloda belirtilmiştir.

Tablo 5: Nonsendromik otizmden sorumlu olduğu düşünülen aday genler

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

Tablo 6: NonSendromik Otizmde varsayılan bazı genler, proteinler ve fonksiyonlar

Protein	Gen Sembolü-Lokus	Fonksiyonu
Neurologin 3	NLGN3-Xq28	Sinaps formasyon ve fonksiyonu
Neurologin 4	NLGN4-Xp22.33	Sinaps formasyon ve fonksiyonu
Neurexin 1	NRXN1-2P16.3	Neurologinler için transsaptik bağlayıcı
SH3 & multiple ankyrin repeat domains	SHANK3-22q13	Post-sinaptik yoğunluğun düzenlenmesi&neurologin bağlanması
Contactin-associated protein-like 2	CNATNAP2-7q36	Nöronal migrasyon dahil contactin moleküller için sinaptik bağlayıcı ortağı
Contactin 4 & Contactin 3	CNTN4&CNTN3-6p26-p25	Adezyon kuvvet molekülleri nöronal ekspresyonu
Protocadherin 10	PCDH10-4q28	Cadherin ilişkili nöronal reseptör
Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM-7q31	Nöronal hücre adezyonu
Methyl CpG binding protein 1	MECP2-Xq28	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Ubiquitin protein ligase E3A	UBE3A-15q11-q13	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Deleted in autism	DIA1 (c3orf58)-3q	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Ataxin 2-binding protein 1	A2BP1 16p13	Nöronal aktivitenin regülasyonu
Engrailed 2	EN2-7q36	Orta beyin ve serebellum gelişimi
Homeobox A1	HOX1-17p15.3	Arka beyin gelişimi
Homeobox B1	HOXB1-17q21-q22	Arka beyin gelişimi
Reelin	RELN-7q22	Nöron migrasyonunda sinyal proteini
WNT2	WNT2 -7q31	Embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu ve belirlenmesinde
FOXP2	FOXP2 -7q31	Embriyogenez ve nöronal işleyişteki transkripsiyon faktörleri
ARX homeobox geni	ARX -Xp22.13	Nöronal gelişimde
Patched domaincontaining 1 geni	PTCHD1-Xp22.11	Nöronal gelişimde
Sodium channel, voltage-gated, type VII	SCN7A-2q	Sodyum kanal geni
Na+/H+ exchanger isoform 9	SLC9A9(NHE9)-3q24	Sodyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	CACNA1C -12p13.3	Kalsiyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	CACNA1H-16p13.3	Kalsiyum kanal geni
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1F	CACNA1F-Xp11.23	Kalsiyum kanal geni
GABA receptor subunits	GABRB3, GABRA5, GABRG3 15q11.2-q12	Beyinde major inhibitor nörotransmitter
Serotonin transporter	SLC6A4 -17q11.1-q12	Nörotransmitter
Mitochondrial aspartate/glutamate transporter	SLC25A12-2q24	Mitokondrial fonksiyonu ve ATP düzeyini koruyucu
Oxytocin receptor	OXTR-3p26.2	Diğer
Laminin beta 1	LAMB1-7q31.1	Diğer
RING finger protein 8	RNF8-6p21.3	Ubikitin ligaz ve transkripsiyonel ko-aktivator

Veriler standart referanslardan derlenmiştir: Gen sembolleri, kromozom lokusları, lokus isimleri, kritik bölgeler Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ‘den alınmıştır.

2.2.4. Otizm, Epilepsi Ve EEG Bozuklukları:

Otizmde artan fakat değişken bir epilepsi riski söz konusudur. Şimdiye kadar rapor edilen epilepsi prevalansının değişkenliğinden 3 ana faktör sorumludur:

1-Yaş

2-Kognitif düzey

3-Dil bozukluğunun tipi

Epilepsi prevalansı adölesan ve genç erişkinlerde, ılımlı ve ciddi zekâ geriliği ile birlikte olan motor defisitlilerde ve ciddi algısal dil bozukluğu olan bireylerde yüksek bulunmuştur. Otizm ve epilepsi birlikteliği bazı vakalarda ortak genetik faktörlerle açıklanabilmektedir. Yinede subklinik epilepsinin kognitif, dil ve davranışlar üzerine olan olumsuz etkisi tartışmalıdır (155).

Yapılan bazı çalışmalar OSB’de nöbet sıklığını artmış olarak bulmuştur. 1979 yılında Deykin ve MacMahon raporlarında puberte’de bu riskin arttığını göstermişlerdir (156).

Çocukluk çağındaki nöbetlerin önemli bir bölümünü genetik sebepler, tanımlanamamış çevresel veya endojen bazı tetikleyici sebeplerin neden olduğu grup oluşturur (157). Geri kalan kısmı ise beyindeki akut, kronik veya difüz patolojiler ile metabolik ve idiopatik nedenler oluşturur.

2.2.4.1. Epilepsi ile ilişkili OSB’nin Etyoloji ve Patofizyolojisi

Genetik olmayan ve tanı konabilen genetik nedenler otizmlili hastaların %10-20 kadarında bulunmaktadır. Nadiren otizm, immatür beyinde epilepsiye yol açabilen ya da yol açamayan, genetik dışı kazanılmış bir hasarın sonucu olarak gelişebilir. Perinatal asfiksi, prematürite, aşılamamanın yan etkileri gibi. Otizm ve epilepsi birlikteliği bazı mendelyen kalıtım özellikleri gösteren hastalıklarda rastlanılan bir durumdur. Tüm çocukluk epilepsi prevalansı ortalama %2-3 iken OSB’da bu oran %30’lara çıkmaktadır. Bu oranlar otizm ve epilepsinin sıkı bir ortak temeli olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak, EEG anormalliklerinin oranı nöbet geçmişi olmayan otistik çocuklarda artmaktadır (158).

Şimdiye kadar OSB'nin nörolojik patofizyolojisi hakkında net bir fikir birliği oluşmamıştır (159). Bazı otopsilerde serebellum, limbik sistem ve neokorteks'te anormal nöronal migrasyon ile birlikte destrüktif lezyondan ziyade hemen göze çarpmayan hücresel gelişim bozukluğu açığa çıkarılmıştır. Görüntüleme çalışmaları ile birçok beyin alanı serebellum ve limbik sistem, özellikle amigdale, frontal lob ve hipokampusu içeren temporal lob alanları incelenmiştir (160-161). Hipokampus epileptogenezde oldukça önem taşıyan bir bölgedir. Temporal lob işitme ve dil sürecinde rol alan kritik bir bölgedir. Her iki bölge de edinsel epileptik afazide etkilenmektedirler (162).

2.2.4.2. OSB'deki Nöbet Tipleri

Tüm nöbet tipleri otizmde görülebilmektedir. Epilepsi prevalansı ve nöbet türleri populasyon çalışmalarında çeşitlilik gösterebilmektedirler. Bazı çalışmalarda kompleks parsiyel, atipik absens, myoklonik ve tonik-klonik nöbetler yaygınken bir diğerinde jeneralize tonik-klonik ve atipik absensler ön plandadır. 1981 yılında Finlandiya'da yapılan bir çalışma, infantil spazm (IS) ve otizm arasında bir ilişki olduğunu, infantil spazmlı çocuklarda pozitron emisyon tomografisi (PET) ile bitemporal glukoz hipometabolizmasının gösterildiği ve ciddi dil bozukluğu ve zeka geriliği olan otizmlilerde de bunun olabileceğini göstermiştir (163). Fakat yinede OSB ile IS arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır.

2.3.4.3. Prevalans ve Risk Faktörleri

Otizmlilerde epilepsi oranı %5 ile %38,3 arasında bildirilmiştir. Yaş aralığı olarak bimodal dağılım göstermektedir. İlk pik infantil dönemde 5 yaşından önce görülürken ikinci pik adolesan dönemde 10 yaşından sonra görülmektedir (164). 6-13 yaş arası epilepsi ve zihinsel engelli 98 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada %27 oranında infantil otistik bozukluk veya başka bir otistik spektrum bozukluğu olduğunu bildirmiştir (163).

Epilepsinin zeka geriliği ile birlikte bulunduğu durumlarda otizm riskinin arttığına dair güçlü kanıtlar olmasına rağmen en az bir çalışmada ciddi davranış bozukluklarında zeka geriliğine göre epilepsi ile ilişki daha fazladır (165).

Şimdiye kadarki çalışmalarda otizmle beraber algısal dil bozukluğu olanlarda, kognitif fonksiyonlarında gerilik olanlarda ve belli yaş gruplarında (infant ve pubertede) epilepsi gelişme riski daha fazla bulunmuştur.

2.3.4.4. EEG Bozuklukları

Otizmli bireylerde EEG anomalilerinin sıklığını belirlemek potansiyel önyargılardan, EEG uygulamalarının çeşitliliğinden ve EEG değerlendirmede kullanılan standartlardan dolayı zordur (166).

OSB'li ve regresyon hikayesi olan ancak klinik olarak nöbeti olmayan çocukların uzun süreli video EEG telemetri çalışmalarında, bu hastaların %46'sında epileptiform EEG anormalliği tespit edilmiştir (167). Bu tür hastalarda yeterli yavaş dalga uykusu örneği içeren uzun süreli video EEG kaydı epileptiform anomaliyi gösterme açısından 1 saatlik rutin kayıtlara göre daha hassastır (162).

Otizme özgü olmamakla birlikte, EEG anormallikleri gösterilmiştir. En sık görülen anormallikler yaygın ya da fokal diken veya yavaş ve paroksizmal diken ve dalga aktivitesidir (149).

Yapılan çalışmalarda en azından dilde gerileme öyküsü olan otistik çocuklarda uzun süreli EEG çalışması önerilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUBU

Çalışmamızda, CDKL5 geninin 4. ekzonundaki A40V, 5.ekzonundaki I72N ve I72T, 7.ekzondaki C152P, 8.ekzondaki R175S, G178D ve P180L, 12.ekzondaki R444C ve 18.ekzondaki L879E mutasyonlarını dirençli nöbeti, OB venöbete ilave OB olan toplam 67 hasta ve sağlıklı 23 kişilik bir kontrol grubunda karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubu üyelerinin her birisine çalışmaya kendi rızaları ile katıldıklarını belgelemek amacıyla gönüllü onam formu doldurulmuş ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan çalışma izni alınarak bilim etiği çerçevesinde çalışma tamamlanmıştır.

3.1.1. Hasta Grubu:

Aralık 2011-Mart 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nöroloji Polikliniğinde klinik olarak elektroensefalogram (EEG) ve nöbet tipine ilişkin bulgulara göre dirençli epilepsi tanısı almış, Çocuk Ruh Sağlığı Anabilim Dalında DSM-IV kriterlerine göre OB ve ilaveten epilepsi tanısı almış 40 erkek ve 27 dişi çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir hastanın 3 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.1.2.Kontrol Grubu:

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran epilepsi, OB hastalığı olmayan bu açıdan sağlıklı, benzer yaş ortalamasına sahip 13 dişi ve 10

erkek kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bu kişiler çalışmaya katılmayı onaylamış ve 3 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.2. KULLANILAN ALETLER

Derin Dondurucu

LightCycler Real Time PZR Cihazı 480 sistem

Mikropipet seti (0,5-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl ölçüm aralığında)

Mikrosantrifüj aleti

Soğutucu

Vorteks

3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

3.3.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu İçin High Pure PZR Template Preparation Kit'inde Bulunan Kimyasal Maddeler

Bağlayıcı (binding) tampon (buffer), (6 M guanidine-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl,

%20 Triton X-100 (v/v), pH:4,4)

Proteinaz K (Liyofilize Proteinaz K)

İnhibitor uzaklaştırıcı (removal) tampon (5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCl, pH:6,6)

Yıkama (wash) tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5)

Elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH:8,5)

3.3.2. Gerçek zamanlı PZR Cihazında (LightCycler) Kullanılan LightCycler Fast Start DNA Master Probe Setinde Bulunan Kimyasal Maddeler

PZR ve tek nükleotid polimorfizmini belirlemek için, LightCycler Fast Start DNA Master Probe seti kullanılmıştır. Kit içeriği Tablo 7 'de verilmektedir.

Tablo 7: LightCycler Fast Start DNA Master Probe seti içeriği

Etiket adı	İçeriği
LightCycler® Fast-Start Enzim-1a LightCycler® Fast-Start Reaksiyon Karışımı HybProbe-1b	Fast Start Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon tamponu, d NTP karışımı ve 10Mm MgCl ₂
MgCl ₂ stok solüsyon(mavi kapak)	25Mm MgCl ₂
PZR-grade(renksiz kapak)	H ₂ O

3.4. HASTA GRUBUNDA CDKL5 GENİNİN BELİRLenen MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI İÇİN İZLENEN YÖNTEM

3.4.1. DNA Eldesi:

Kandan genomik DNA eldesi için High Pure PZR Template Preparation Kit'i (Ref#11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır.

Çalışma grubuna dahil olan 26 dirençli epilepsi, 19 OB, 22 OB' ye ilaveten epilepsi ve 23 kontrol grubu bireyinden, çalışma anına kadar -20° C'de saklanan 3ml kan EDTA'lı tüplere alınmış ve DNA eldesi için aşağıda sıralanan aşamalar uygulanmıştır.

Liyofilize haldeki Proteinaz K'ya 5 ml distile su ilave edilmiştir. Inhibitör Removal Buffer (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) 20 ml etanol eklenerek, yıkama solüsyonu (wash buffer) (Ref# 11 796 828001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) 80 ml etanol eklenerek hazırlanmıştır. Ön hazırlık aşamasından sonra aşağıdaki işlem sıralaması uygulanmıştır;

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alındı.
2. Üzerlerine 200 µl Binding Buffer (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve 40 µl Proteinaz K (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) eklenerek iyice karıştırıldı.
3. Karışım 10 dakika 70 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. DNA' ların çökmesini sağlamak için, daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Hasta sayısı kadar toplama tüpü çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım toplama tüplerine aktarıldı.

6. Tüplerdeki karışım 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi ve 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g' de 1 dk santrifüjedildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g' de 10 saniye karıştırıldı.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml' lik ependorf tüplerine alındı.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 70 °C' de bekleyen elutionbuffer dan (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) 200 µl eklendi.
16. Ependorf tüplerindeki karışım 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
17. Elde edilen DNA sonra çalışılmak üzere -20 derecede saklandı.

3.4.2. DNA Saflığı ve Konsantrasyonun Ölçülmesi

İzole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop 2000 cihazında spektrofotometrik ölçümlerle hesaplandı.

Spektrofotometrik okuma ~ 260nm ve ~280nm dalga boyunda, TE tamponu ile yapıldı.

Nükleik asitlerin saflığı A260/A280 oranı ile de saptanabilmektedir. Bu oran ~1,8 olmalıdır.



Şekil 8: NanoDrop 2000 cihazı

3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-PZR (*Polymerase Chain Reaction -PZR*): PZR DNA’da bulunan ve dizisi bilinen iki bölge arasındaki özgün bir segmenti enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan reaksiyonlara verilen ortak bir isimdir. İnvitro ortamda nükleik asitlerin çoğaltılması, bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonunun, bir tüp içinde taklit edilmesidir. DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir.

Yöntemin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin 2 ucuna özgü olan ve buradaki dizilerle eşleşebilen (hibridize olabilen) sentetik oligonükleotidler yani ileri ve geri primerler kullanarak bu kısmın enzimatik olarak sentezlenmesidir. Bir PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler;

- Oligonükleotidler: Bölgeye özgü ileri ve geri primerler
- Kalıp DNA
- Deoksiribonükleozid trifosfatlar(dNTP)
- DNA polimeraz enzimi: İlk ve en sık kullanılanı Taq DNA polimeraz enzimidir.
- Tampon çözelti: Tris-HCL, pH 8.8, (NH₄)₂SO₄, Tween® 20
- MgCl₂

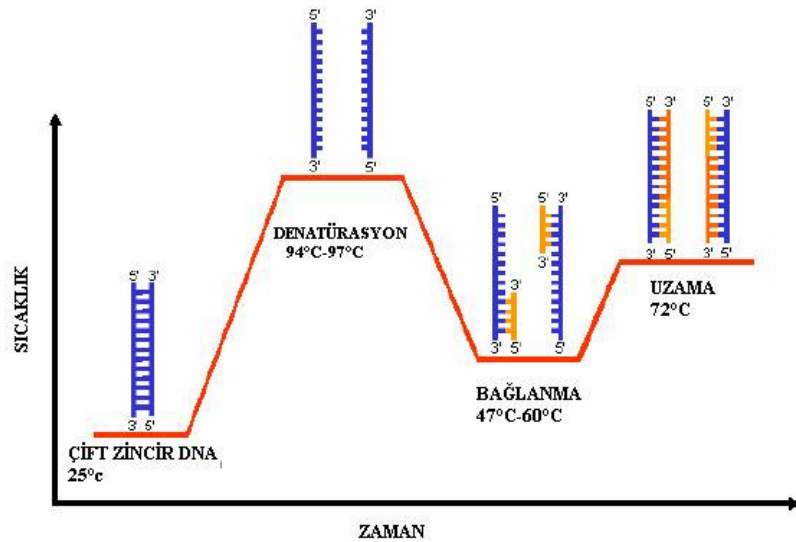
Kullanım Alanları:

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

3.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) Basamakları:

PZR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. DNA çift sarmalının birbirinden ayrılması (denatürasyon), ileri ve geri primerlerin hedef dizilere bağlanması (annealing), primerlerden itibaren zincirin uzatılması (extension) aşamalarından oluşur.

1. İlk basamak denatürasyondur ve yaklaşık 94 °C'ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur.
2. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 45-60°C arasındadır.
3. Üçüncü basamak zincirin uzatılması aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72°C'ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır. Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Bir PZR döngüsünün her bir aşaması belirli sıcaklıklarda gerçekleşir.



Şekil 9: PZR döngüsünün sıcaklık aşamaları

3.4.3.2. PZR Çeşitleri

3.4.3.2.1. Klasik PZR

Hedef dizisinin her iki ucuna özgü primerler kullanılarak DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PZR türüdür.

3.4.3.2.2. Real-Time PZR

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PZR yöntemidir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR, reaksiyon sırasında her döngü sonunda oluşan ürün miktarının, boya ya da probaların hedef bölgeye hibridize olması sonucu oluşan ışımanın (floresans) kamera ile görüntülenmesiyle gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir.

3.4.3.2.3. Multiplex PZR

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

3.4.3.2.4. Revers Transkripsiyon PZR

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

3.4.3.2.5. Nested PZR

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

Tablo 8: PZR çeşitlerinin karşılaştırılması

PZR	HEDEF	UYGULAMA	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
KLASİK	DNA	DNA dizisinin amplifikasyonu ve araştırılması	En kolay uygulanan PZR tipi, düşük maliyetli ve az donanım gereksinimi	Amplifikasyon sonrası analiz gerektirir. Daha fazla zaman, araç/gereç harcanır. İnsan hatası ve kroskontaminasyon riski taşır. Elde edilen ürünün prob hibridizasyonu veya dizileme ile doğrulanması tercih edilir.
MULTİPLEX	DNA	İki veya daha fazla sayıdaki farklı DNA dizisinin aynı anda amplifikasyonu (Klasik ve Real time 'de uygulanır)	Çoklu hedef dizisinin tek bir reaksiyonda amplifikasyonu ile zaman ve araç/gereç tasarrufu.	Primer seçim olanakları sınırlıdır. Önemli ölçüde optimizasyon gerektirir. Çoğunlukla hassasiyeti ve özgünlüğü düşüktür.
REVERSE TRANSKRİPTAZ	mRNA, rRna, viral RNA	RNA 'nın amplifikasyonu ve araştırılması	Tüm RNA çeşitlerinin amplifikasyonu	RNA'nın çabuk bozulması. Ek RT aşaması daha fazla zaman ve para gerektirir, kontaminasyon riski taşır.

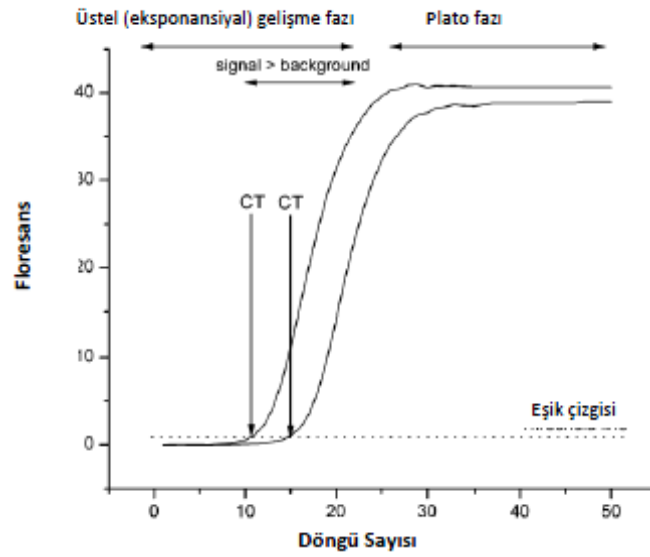
NESTED	DNA	External ve internal primer takımları kullanılarak	Daha hassas, nonspesifik amplifikasyonun azaltılması	İlk amplifikasyon sonrası ürünün taşınması nedeniyle yanlış pozitif sonuç ihtimali vardır. İlk amplifikasyon aşamasından sonra örnek hazırlama için ek oda gereksinimi vardır.
REAL-TIME	DNA	Hedef nükleik asit dizisinin kopya sayısının tespiti ile quantifikasyon	Hızlı, bağıl veya kesin hedef dizi quantifikasyonu. Genellikle amplifikasyon sonrası analize gerek duyulmaz. Prob ve melting curve(erime eğrisi) kullanıldığı için daha kesin sonuç. Daha az kroskontaminasyon riski vardır	Daha pahalı ekipman ve sarf malzeme gerektirir. Primer ve prob seçimi sınırlıdır. Doğrulama analizlerine (dizileme gibi) izin vermez.

3.4.3.3. Real-Time PZR: (RT-PZR)

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç verebilen PZR yöntemidir. Bu yöntemle agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu teknoloji “kinetik PZR”, “homojen PZR” “kantitatif Real-time PZR” isimleriyle de tarif edilmektedir. Gen anlatımının analizini

değiştiren bu metot ile geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PZR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. En sık kullanım alanlarını DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi alanlardır

RT- PZR, oluşan ürüne bağlanan ve ışığa veren raportöre gereksinim duyulmaktadır.. Bu oluşan ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturur. PZR siklusları neticesinde oluşan kısa dizilere ampikon denir. Başlangıç PZR sikluslarında, RT- PZR'da sinyal zayıftır. Bu sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik değere ulaşması için gereken siklus sayısına CT (threshold cycle = eşik değer döngü) değeri adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri CT değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar.



Şekil 10: RT-PZR cevap eğrileri

Gerçek zamanlı PZR'da floresans raportörler kullanılmaktadır. Hedef bölgenin kopyası sayısı arttıkça floresan raportörlerden alınan sinyal miktarıda artmaya başlar. Bütün RT-PZR sistemleri floresan boyaları algılar ve sonrasında floresan sinyalleri ile oluşan PZR ürün miktarını korele ederler. Bunun için çeşitli metodlar kullanılır. En sık kullanılan floresan formatları 2 sınıfa ayrılır.

1. Sekans bağımsız tarama analizleri

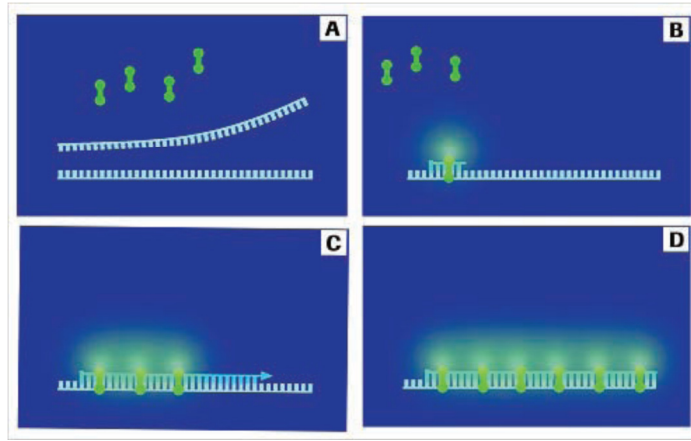
- SYBR Green 1
- Ethidium Bromide

2. Sekans spesifik prob bağlanma analizleri

- Hidroliz Probe(TaqMan format)
- Hibridizasyon Probe
- Simple Probe

3.4.3.3.1. SBYR Green 1

dsDNA'ya bağlanan floresan boya olup RT-PZR için basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. SYBR Green 1 solüsyon içinde serbest durumda zorlukla floresan verirken DNA'ya bağlayken ışıma miktarı büyük oranda artar. Sinyal miktarı oluşan ürün miktarı ile birlikte doğru orantılı olarak artar. Bu yöntem PZR'da kolaylıkla uygulanabilir çünkü ilaveten floresan işaretlenmiş oligonükleotidlere ihtiyaç duymaz. Ancak optimizasyonu iyi yapılmalıdır çünkü hem spesifik hem de non-spesifik PZR ürünlerinin algılanması gibi bir durum söz konusudur. Sybr Green herhangi bir dsDNA'ya bağlandığı zaman, boya farklı dsDNA türleri arasında ayrım yapmaz. Spesifik, non-spesifik ürünler, primer-dimerler aynı şekilde algılanır. Herhangi bir PZR artefaktı hedef sekansın konsantrasyonunun abartılı bir şekilde artmasına neden olabilir. Melting Curve analizi ile ürün ve primer-dimer arasında ayrım yapılabilir.



Şekil 11: SYBR Green 1 varlığında PZR

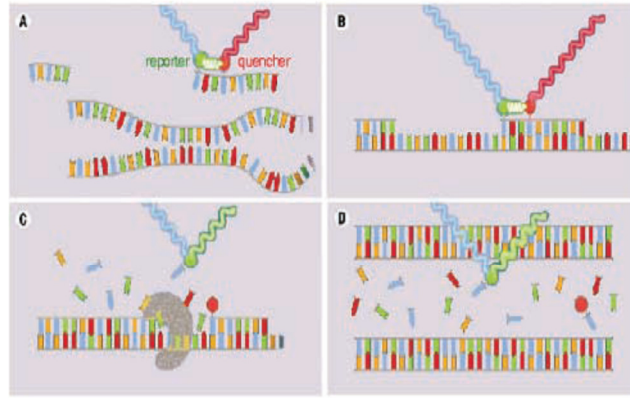
- Denatürasyondan sonra DNA tek zincirli hale geliyor.
- Anneling esnasında primerler hedef sekansla hibridize olur, SYBR Green 1 küçük bir bölgeye bağlanır. Böylece floresan ışıma artar.
- Elongasyon fazında primerler uzar ve daha fazla boya bağlanır.
- Elongasyonun sonunda DNA çift zincirli hale gelir ve maksimum boya bağlıdır.

3.4.3.3.2. Hidroliz Problemleri

cDNA örneğindeki hedef dizinin miktar tayini için Taq polimerazın floresan 5' ekzonükleaz aktivitesini kullanılır. TaqMan (PE Biosystem), Beacons, Scorpions.

TaqMan problemleri 5' ucunda floresan işaret molekülü (raporter) ve 3' ucunda quencher bulundurulur ve problemler primerlerden daha uzundur. Floresan molekül uyarıldığında zaman enerji transferi quencher molekülden daha fazla olduğu için ışınım oluşur. Problemler PZR ürününün iç bölgesine bağlanırlar. DNA'da replikasyon olurken TaqMan probun 5' ucuna geldiği zaman ekzonükleaz aktivitesi ile probu kırar. Böylece raporier molekülü serbest kaldığı ve quencher da uzaklaştığı için ışınım yapar. Işınım miktarı her siklusda kırılan prob sayısı ile orantılı olarak artar.

İyi dizayn edilmiş TaqMan problemleri çok az optimizasyon gerektirir.



Şekil 12: Hidroliz problemleri varlığında PZR çalışması.

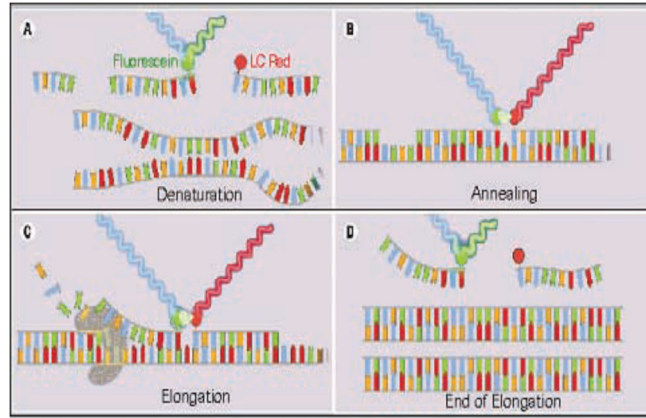
Prob 2 adet floresan boya taşır. Şekil A'da sıcaklık artışı ile hedef DNA zinciri ayrılmaya başlar. Annealing fazında ise (Şekil B) primer ve prob hedef sekansla spesifik olarak birleşir. Hidroliz probu 3' ucundan fosforillenir ve uzayamaz. DNA polimeraz primer gibi uzadığında, 5' nükleaz aktivitesi gösteren kısım ile birlikte probdan ayrılır (Şekil C).

Prob fragmentı hedeften ayrıldıktan sonra yeni ampikonların polimerizasyonu devam etmektedir (Şekil D).

TaqMan PZR analizi sonrasında tüm problemler sindirilir (Şekil D). Melting curve analizi yapılamaz. Bundan dolayı SNP veya mutasyon analizlerinde bu tip analizler başka yöntemlere de gereksinim doğururlar.

3.4.3.3. Hibridizasyon Problemleri

Hedef DNA dizisi çoğaltılır (amplifikasyon), oluşan tüm ampliconlar yavaş yavaş ısıtılırken floresan sinyali toplanır. Bu sayede SNP grupları birbirinden ayrılır. Bu problemler amplifikasyon sırasında, hidroliz problemlerinin aksine parçalanmazlar. Bu sayede amplifikasyonun hemen ardından ikinci bir işleme gerek olmaksızın melting curve analizi yapılabilir. Hibridizasyon prob kullanımı, PZR'ın amplifikasyon fazında amplifiye olmuş kısmın spesifik bir dizisine hibridize olması için özel olarak dizayn edilmiş iki tane işaretli oligonükleotid kullanır. Bunlardan biri 3' ucundan floresan ile işaretlenmiş ve donör adı verilen bir prob, ikincisi ise akseptör adı verilen ve 5' ucundan LightCycler Red ile işaretlenen bir probdur. Bu etiketler, sadece oligonükleotidler hedef üzerinde doğru yerlere gelir ise birbirlerine çok yakın bulunurlar ve böylece floresan rezonans enerji transferini (FRET) mümkün kılarlar. Yayılan floresan miktarı, PZR sonucunda oluşturulan hedef DNA miktarı ile doğrudan orantılıdır.



Şekil 13: Hibridizasyon problemleri varlığında. PZR

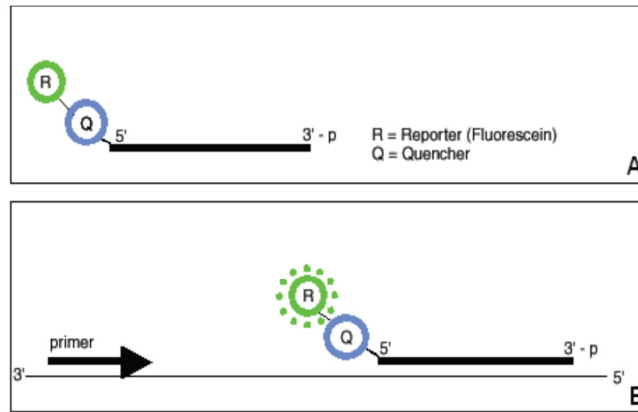
Donör boya probunun 3' ucunda bir floresan etiketi ve akseptör boya probu 5' ucunda bir LightCycler kırmızı etiket bulundurmaktadır. PZR denatürasyon fazında hibridizasyon görülmemektedir (Şekil A). Serbest boyalar arasındaki mesafe enerji transferini engellediği için bu aşamada kırmızı akseptör boyasından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

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

3.4.3.3.4. Simpleprobe Problemleri

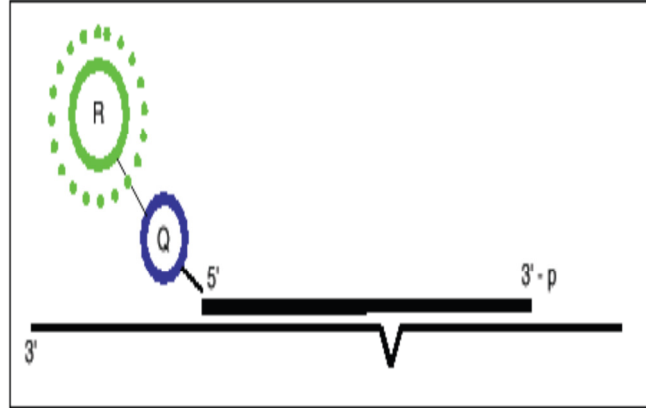
Bizim çalışmamızda kullandığımız rapörtör SimpleProbe problemleridir. Single-labeled problemler, SNP ya da mutasyonları belirleyebilen basitleştirilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir şeklidir. Bu yüzden simpleProbe olarak adlandırılan prob formatı, sekansa spesifik olmayı başarmak için yalnız bir floresan ile etiketli tek bir hibridizasyon probunu gerektirir. Genellikle bu tip problemler özellikle SNP ile alakalı bölgeyi içeren bir hedef sekansa hibridize olması için tasarlanmıştır. Prob hedef sekans ile hibridize olduğunda SimpleProbe hibridize olmadığı zamankinden çok daha fazla floresans yayar. Sonuç olarak floresansdaki değişiklik yalnızca probun hibridizasyon durumundan köken alır.

SimpleProbe problemleri mutasyon tespiti ve SNP genotiplendirmekte mükemmel materyallerdir, çünkü bu problemler kolayca wild-type, mutant ve heterozigot örnekleri sadece tek iplikli kısa bir prob ile belirlerler.



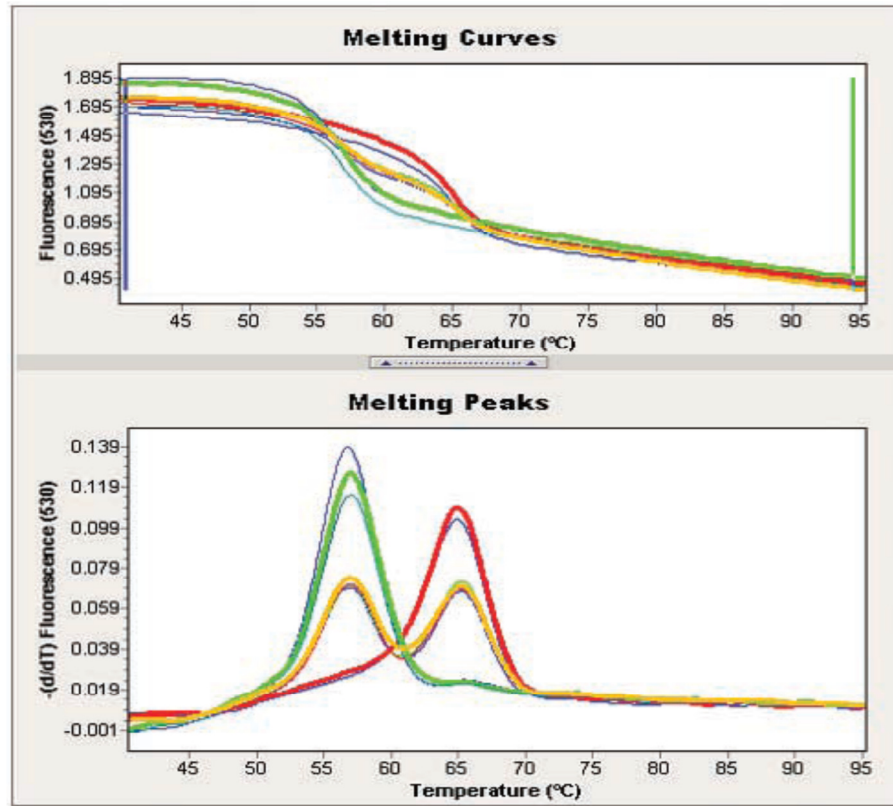
Şekil 14: SimpleProb Analiz Prensibi

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



Şekil 15: SimpleProbe formatı ile SNP tespiti

SNP analizi için Lightcycler cihazı SimpleProbe'un erime davranışını ekranda gösterir (Şekil 14). Sıcaklık arttığı zaman, floresan ölçülerek; probe-hedef hibritlerinin erime sıcaklığı tespit edilebilir. Erime sıcaklığının daha yüksek olması, SimpleProbe ve hedef sekans arasında hibridizasyonun daha karalı olduğunu gösterir. SNP'ler gibi mutasyonlarda SimpleProbe bağlanma stabilitesini zayıflatırlar.



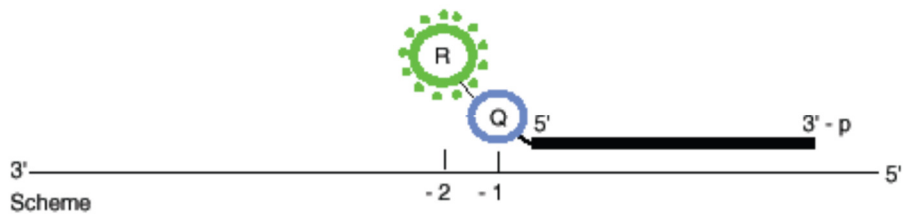
Şekil 16: SimpleProbe' nin erime eğrisini davranışının LightCycler cihazındaki görünümü

A grafiği örnek floresan sıcaklığını gösterir (erime eğrisinin verisi). Her bir örnekte floresan sinyali açık bir şekilde sıcaklığın artmasıyla azalmaktadır. Probun yeri kendi hedefinden değiştirildiği zaman SimpleProbe'un baskılanışı yansır.

B grafiği her bir örneğin pik olarak erime sıcaklığını gösteren örnek floresan sıcaklığı ilk negatif türevini konu alır. Bu analiz, bu örnekle wild-type örnekleri (sekans ve prob arasındaki mükemmel eşleşmeyi yansıtan daha yüksek erime piki) açık bir şekilde mutant örneklerden (sekans ve prob arasındaki yanlış-eşleşmeyi yansıtan daha düşük erime piki) ayırabilir.

3.4.3.3.5. SimpleProbe Problemleri İçin Dizayn Faktörleri

Başarılı bir SimpleProbe dizaynı için özellikle ters komplementer bölgelere (probun bağlandığı DNA bölgesi) dikkat edilmelidir. Probun tespit kapasitesini test etmek için yapay bir ters komplementer oligo kullanılır. SimpleProbe probunun ön kısmının genellikle mutasyon bölgesini kapatması tavsiye edilir; probun hem 3' hem 5' son kısmının yakınında olan mutasyonu kapatan sekansa izin verilmemelidir. Direk olarak floresan etiketin aşağısındaki hedef bölge (pozisyon -1, -2) C ya da T içermesi daha iyidir, bu pozisyonda G olmasına engel olunur (Şekil 15). Çünkü raporter moleküle komşu G ışınımı engeller. Çift-iplikli DNA ile floresan boyanın aynı hizada stabil kalması için 1-4 pozisyonları arasında harekete izin verilmez. Bazı durumlarda, ikincil yapılar single-labeled problemlerin özel fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu gibi durumlarda SimpleProbe yerine Hybridization problemlerinin tercih edilmelidir.



Şekil 17: Simple Problemlerin dizaynı

Amplifikasyonun sonunda SimpleProbe problemleri de hibridizasyon problemlerinde olduğu gibi ortamda parçalanmadan kalabildiği için SNP belirlenmesinde bu problemler erime (melting) eğrisi analizlerinde kullanılabilir ve böylece SNP'lerin tanımlanması mümkün olacaktır.

Melting eğrisi analizi ile farklı alleler birbirinden ayrılabilir. PZR ile spesifik bölgenin çoğaltılmasının ardından, melting eğrisi analizi ile ampikon karakterize edilir. T_m değeri çift sarmal DNA'nın yarısının denatüre olduğu sıcaklık değeridir, buna göre her bir ampikonun melting değeri o ampikonun boyuna, sekansına, guanin-sitozin içeriğine bağlıdır ve karakteristiktir. Bu sayede melting eğrisi analizi PZR ürününün tanımlanmasına imkân sağlar. PZR'ın amplifikasyon aşamasının ardından sıcaklık önce düşürülür, bu sırada yüksek bir floresan sinyali alınır, sonra sıcaklık yavaş yavaş düşürülerek floresan miktarındaki düşüş izlenir ve PZR ürününün melting noktası belirlenir.

3.5. RT-PZR Yöntemi İle CDKL5 Geninde A40V, I72N ve I72T, C152P, R175S, G178D ve P180L, R444C ve L879E Mutasyonlarının Analizi:

Kandan elde edilen DNA'lardan, RT-PZR yöntemi ile CDKL5 geninde A40V, I72N ve I72T, C152P, R175S, G178D ve P180L, R444C ve L879E aminoasit değişimlerine neden olan mutasyonların olduğu gen bölgelerinin uygun RNA primerleri ile çoğaltılmasında kullanılan primerler ve baz değişimini belirlemek amacı ile kullanılan problemler (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Almanya) tasarlandı. Bu problemlerden 119C>T, 533G>A, 1330C>T ve 2535_2536 delCT mutasyonlarına ait olanları mutant tipe göre tasarlanırken diğerleri wild tipe göre tasarlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemi LightCycler® 480 cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Her bir mutasyon için ayrı ayrı tasarlanan problemlerin 5' ucunda raporter (floresin) boyası ve quencher(non-floresin) bulunur. Çalışmadaki problemler 5' ucunda LightCycler Red 640 ile işaretli olan problemlerdir. Analizde ilk aşamada enzimin aktive olması için 95 °C'de denatürasyon işlemi gerçekleştirilir. Bir sonraki aşama ise PZR döngüsüdür. Sırasıyla 95,55 ve 72 °C'de denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları gerçekleşir. Döngü sayısı 45'dir ve her döngü sonunda ürün miktarı logaritmik olarak artar. SNP'lerin belirlendiği aşama olan 3. aşamada yeni oluşan çift zincirli DNA 95 °C'de denatüre edilir ve 40 dereceye kadar ısı yavaş yavaş düşürülür. Bu ısı düşürülme aşamasında LC Red 640 boyası ile etiketli olan prob hedef sekansa bağlanır. Wild tipe göre tasarlanan problemler eğer ki mutasyon yoksa hedef sekansla oldukça uyumlu şekilde ve sıkı bir bağ ile bağlanır. Ama mutasyon varlığında bu bağ zayıf şekilde oluşur. Son aşamada sıcaklık tekrar artırılırken (75 °C'ye kadar) ilk durumda bağların sıklığından dolayı erime eğrisi analizinde daha yüksek bir sıcaklık

elde edilirken ikinci durumda daha düşük bir sıcaklık elde edilir. Mutant tipe göre tasarlanan problarda yine aynı sistematik ile çalışmaktadır.

PZR işlemi için PZR karışımı hazırlandı. Son hacmi 20 µl olan PZR karışımının içeriğinde; 12,4 µl H₂O, 1,0 Ml reaksiyon mix, 2,0 µl FastStart DNA Master(LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostic) 3mM MgCl₂ ve 3µl kalıp DNA (1-5 µl) bulunmaktadır. PZR reaksiyonu için sıcaklık döngüleri Tablo 9’ da verilmektedir.

Tablo 9: LightCyler 1,5 sistem ve 480 sistem cihazlarında RT- PZR yönteminde analiz aşamaları

Analiz Aşamaları	Döngü Sayısı		Sıcaklık(°C)	Süre
Denatürasyon	1		95	10 dk.
Cycling	45	Denatürasyon	95	10 sn
		Bağlanma	60	10 sn
		Uzama	72	15 sn
Melting (SNP belirlemek için)	1	Denatürasyon	95	30 sn
		Bağlanma	40	2 dk
		Melting	75	0
Cooling	1		40	30 sn

LightCyler 480 cihazı ise 610, 640 ve 670 nm dalga boylarında okuma yapma imkanına sahiptir. 96 veya 384’lük well plate kullanabilme avantajına sahip bir cihazdır (www.roche-appliedscience.com/sis/rtPZR/index.jsp?refer=slider).



Şekil 18: LightCycler 480 sistemi

Reaksiyon karışımı belirlenen polimorfizmi çalışmak üzere LightCycler 480 sistem 96'lık plate'lere yüklendi. Yüklemeden sonra plate'lerin üzeri LightCycler 480 Sealing Foil ile sıkıca kapatıldı. Daha sonra 2500 rpm'de 30 sn.santrifüj edildi ve daha sonra LightCycler 480 cihazına yerleştirildi.

4.BULGULAR

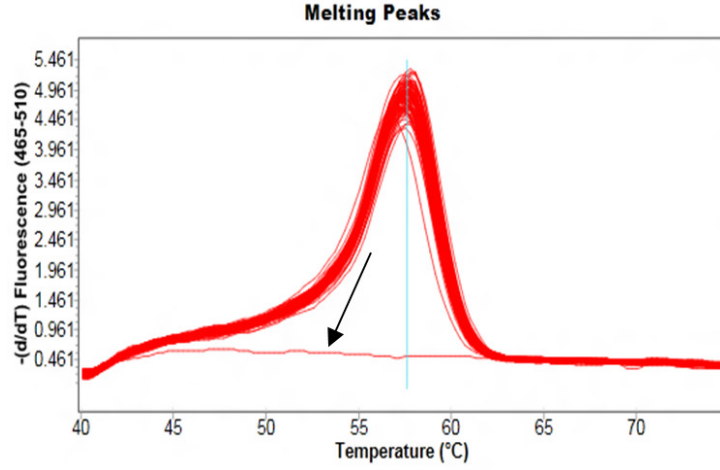
4.1. CDKL5 GEN MUTASYONLARI GENOTİPLEMELERİ

1. CDKL5 geni A40V Genotipleme

LightCycler 480 sistem cihazında LC-Red 640ışaretili probdan alınan sinyale göre melting eğrisi analizi yukarıda belirtilen polimorfizmler için genotipleme, materyal ve metod bölümünde belirtildiği gibi yapılmıştır.

CDKL5 geninde 119. nükleotiddeki C>T yer değişimi ile 40.pozisyonundaki alanin aminoasidinin valin aminoasidine dönüşmesi (A40V) sonucu üç farklı genotip ortaya çıkar. Normal (wild type), heterozigot ve homozigot. Melting eğrisine göre floresans sinyali, C için 55 C°'de T için 60 °C'de alınmaktadır. Melting eğrisinde 55 C°'de tek bir pik varsa genotip normal, hem 55 hem de 60 C°'de iki pik varsa heterozigot, 60 C°de tek bir pik varsa homozigot genotip olduğu sonucunu vermektedir. LightCycler 480 sistem cihazında gerçek zamanlı PZR yapıldıktan sonra elde edilen melting eğrisi analiz sonuçları şekil 19'da gösterilmektedir.

Çalışmaya dahil edilen toplam 67 hasta ve 23 sağlıklı bireyin, LightCycler 480 sistem cihazında A40V mutasyonuna yönelik melting eğrisi analizi sonuçlarına göre 55 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol ve hasta grubundaki kişilerin genotipleri normal kabul edilmiştir.



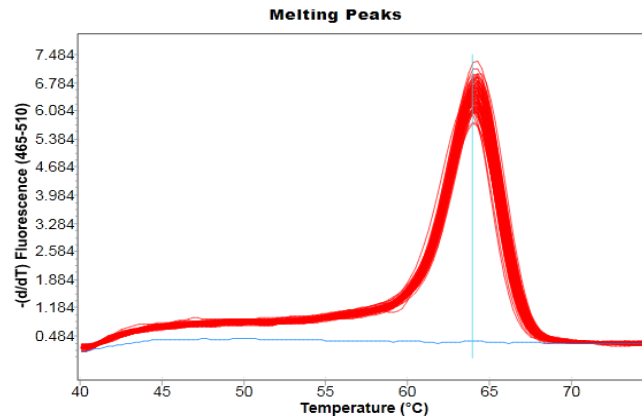
Şekil 19: A40V genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

Not: Okla işaretli örnek negatif kontroldür ve DNA yerine su kullanılmıştır.

2. CDKL5 Geni I72N,I72T Genotipleme

CDKL5 genin 215.nükleotiddeki T>A yer değişimi ile 72. pozisyondaki izolösünün asparagine dönüşmesi söz konusudur. Aynı zamanda T>C yer değişimi ile izolösünün treonine de dönüşebilmektedir. Floresan sinyali, T için 62 °C’de A için 57 °C’de ve C için 56 °C alınmaktadır.

Çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen melting eğrisi analizine göre normal kabul edilmiştir. Her iki grupta da heterozigot veya homozigot bireye rastlanmamıştır.

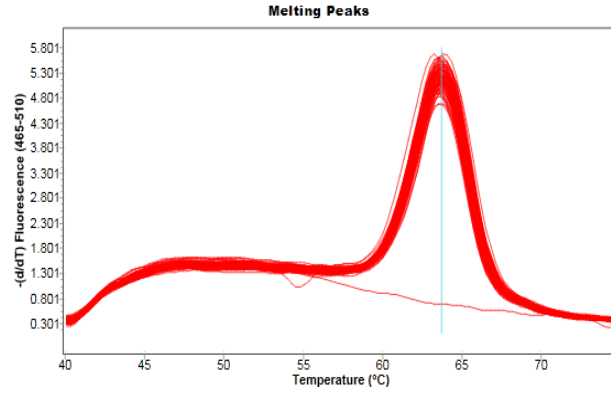


Şekil 20: I72N/I72T genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

3. CDKL5 Geni G178D Genotipleme

CDKL5 geninde 533.nükleotidde G>A yer değişimi sonucu 178. pozisyonunda bulunan glisin aminoasidinin aspartata dönüşümü gerçekleşmektedir. Floresan sinyal G için 61 °C’de, A için 66° C alınmaktadır.

Çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen melting eğrisi analizine göre normal kabul edilmiştir. Her iki grupta da heterozigot veya homozigot bireye rastlanmamıştır.

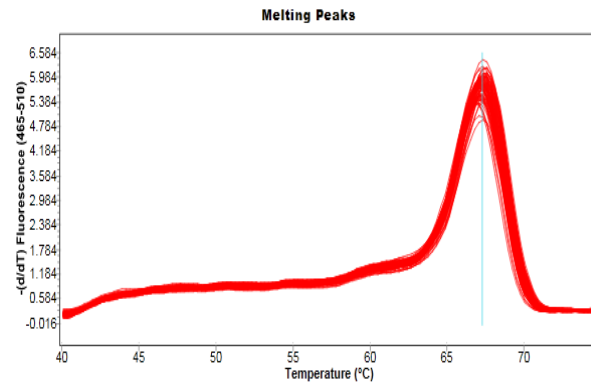


Şekil 21: G178D genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi

4.CDKL5 Geni C152P Genotipleme

CDKL5 geninde 455.nükleotiddeki G>T yer değişimi neticesinde 152. pozisyonundaki sistein aminoasidi fenilalanine dönüşmektedir. Burada sinyal G için 65 °C, T için ise 58° C derecede alınmaktadır.

Çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen melting eğrisi analizine göre normal kabul edilmiştir. Her iki grupta da heterozigot veya homozigot bireye rastlanmamıştır.

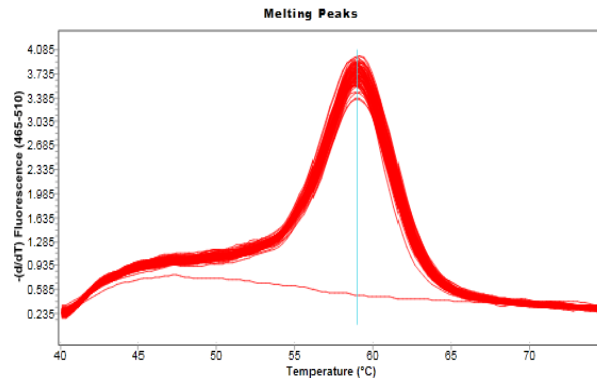


Şekil 22: C152P genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

5.CDKL5 Geni L879E Genotipleme

CDKL5 geninin 2535. ve 2536. sırasındaki C ve T nükleotidlerinin delesyonu sonucu 879. pozisyonundaki lösin aminoasidi glutamata dönüşmektedir. Floresan sinyal CT nükleotidlerinin varlığında 65 °C’de, delesyon durumunda 57 °C alınmaktadır.

Çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen melting eğrisi analizine göre normal kabul edilmiştir. Her iki grupta da heterozigot veya homozigot bireye rastlanmamıştır.

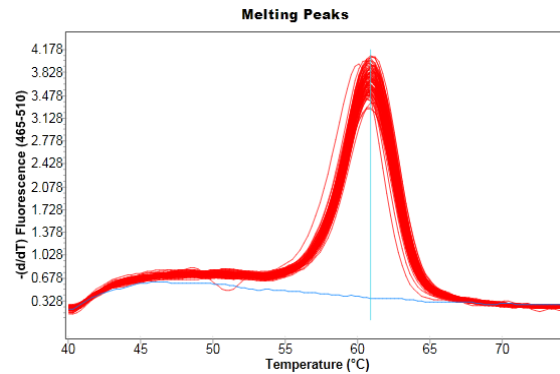


Şekil 23: L879E genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

6.CDKL5 Geni R444C Genotipleme

CDKL5 geninde 1330.nükleotidde C>T yer değişimi sonucu 444.pozisyonunda bulunan arginin aminoasidi sisteine dönüşmektedir. Floresan sinyal C için 60 °C’de, T için 66 °C alınmaktadır.

Çalışmada tüm hasta ve sağlıklı bireylerin genotipleri elde edilen melting eğrisi analizine göre normal kabul edilmiştir. Her iki grupta da heterozigot veya homozigot bireye rastlanmamıştır.

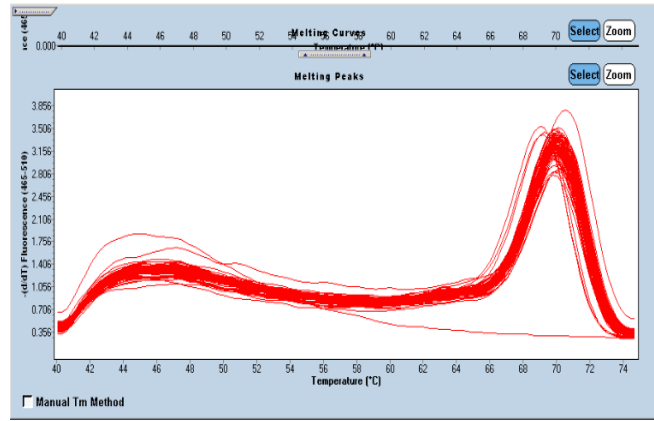


Şekil 24: R444C genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

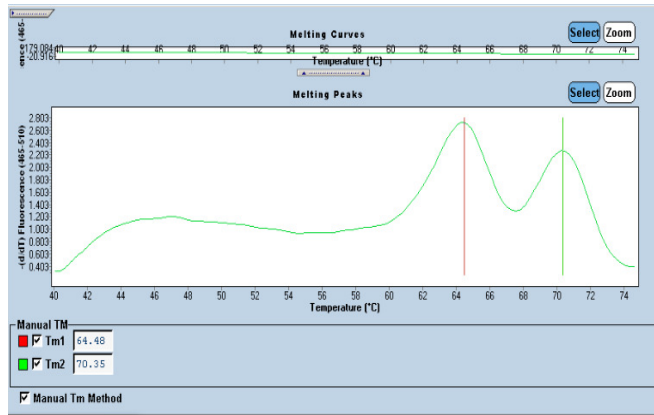
7.CDKL5 Geni A175S Genotipleme

CDKL5 geninde 525.nükleotidde A>T yer değişimi sonucu 175.pozisyonda bulunan alanin aminoasidi serine dönüşmektedir. Floresan sinyal A için 68 °C' de, T için 64 °C' de alınmaktadır.

Çalışmada LightCycler 480 sistem cihazında A175S mutasyonuna yönelik melting eğrisi analizi sonuçlarına göre; dirençli nöbet hasta grubunda 1 kız hastanın heterozigot genotipe sahip olduğu belirlenmiştir.



A



B

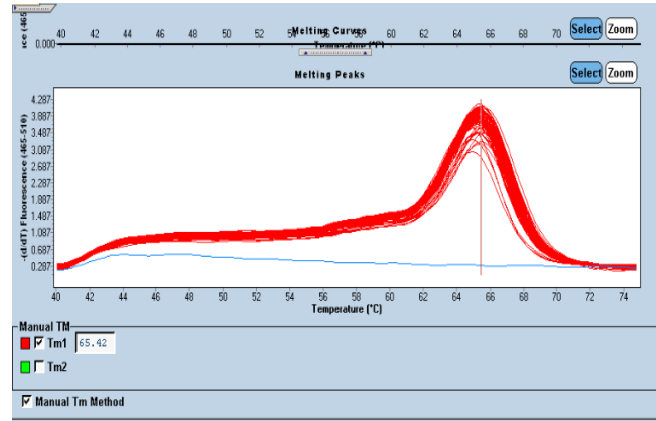
Şekil 25: R175S genotipi için hasta ve kontrol grubu örneklerinin melting analizi.

A örneğinde $68 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ 'de tek pik alındığı için tüm örnekler normal kabul edilirken B'deki örnekte hem 70°C 'de hem de 65°C 'de iki pik görülmekte. Bu durumda R175S genotipi için bu vaka heterozigot mutant kabul edildi.

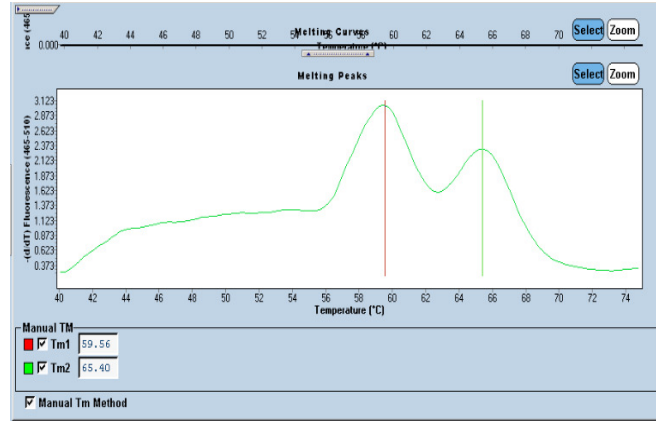
8. CDKL5 Geni P180L Genotipleme

CDKL5 geninde 539.nükleotidde C>T yer değişimi sonucu 180.pozisyonda bulunan fenilalanin aminoasidi l3sine d3n3şmektedir. Floresan sinyal C için 63 3C'de, T için 54 3C alınmaktadır.

Çalışmada LightCycler 480 sistem cihazında P180L mutasyonuna y3nelik melting eğrisi analizi sonuçlarına g3re; dirençli n3bet hasta grubunda 1 kız hastanın heterozigot genotipe sahip olduğu belirlenmiştir.



A



B

şekil 26: P180Lgenotipi için hasta ve kontrol grubu 3rneklerinin melting analizi.

A'daki 3rneklerde $65 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ 'de tek pik alındığı için t3m 3rnekler normal kabul edilirken B'deki 3rnekte hem 60°C 'de hem de 65°C 'de iki pik g3r3lmekte. Bu durumda hasta P180L genotipi için heterozigot mutant kabul edildi

4.2. Hasta ve Kontrol Grubu Bulguları

Dirençli nöbet, otistik bozukluk ve nöbete ilaveten otistik bozukluk tanısı almış 67 hasta ve kontrol grubundaki 23 kişi ile ilgili bulgular genel bir tabloda gösterilmektedir.

Tablo 10: Hasta ve kontrol grubu verileri

	Kontrol	Dirençli Nöbet	Nöbet ve OB	OB
Cinsiyet				
E	11 (%48)	11 (%43)	11 (%50)	16 (%84)
K	12 (%52)	15 (%57)	11 (%50)	3 (%16)
Yaş Ort.	3.7±1,8	5.1±3.8	7,02±3,3	6,8±2,6
A40V				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
I72N/I72T				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
C152P				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
G178D				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
L879E				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
R444C				
Normal	23 (%100)	26 (%100)	22 (%100)	19 (%100)
A175S				
Normal	23 (%100)	25 (%96)	22 (%100)	19 (%100)
Heterozigot		1 (%4)		
P180L				
Normal	23 (%100)	25 (%96)	22 (%100)	19 (%100)
Heterozigot		1 (%4)		

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran sağlıklı 13 dişi ve 10 erkekten oluşan kontrol grubundaki 23 kişinin yaş ortalaması 3,7±1,8.

Çalışmaya dahil edilen dirençli nöbet tanısı almış 11 erkek 15'i dişi olan 26 olgudan oluşan hasta grubunda yaş ortalaması 5,1±3,8, 16 erkek 3 dişi toplam 19 olgudan oluşan

OB tanısı almış hasta grubunda yaş ortalaması $6,8\pm2,6$ ve 11 erkek 11 dişi 22 olgudan oluşan OB ve ilaveten epilepsi tanısı almış hasta grubunda yaş ortalaması ise $7,02\pm3,3$.

Anova varyans analiz testine göre kontrol grubu dirençli epilepsi hasta grubu ile yaş ortalaması bakımından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamışken ($p>0.05$) OB ve OB' ye ilave epilepsili hasta grubuyla aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Hasta ve kontrol grubu cinsiyet dağılımı bakımından karşılaştırıldığında Pearson Ki-kare testine göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kontrol grubunda CDKL5 geninin bakılan polimorfizmleri açısından 23 bireyin hepsinin genotipi de normal bulunmuştur.

4.3. Hasta Grupları Bulguları

Tablo 11: Nöbet başlangıç yaşları açısından karşılaştırma

Grup	Olgu Sayısı	Yaş	Nöbet Başlangıç Yaşı (ay)
DirençliNöbet	26	$5,1\pm3,8$	6 (2,75-7,75)
Nöbet ve OB	22	$7,02\pm3,3$	15,5 (5,75±25,50)

$p=0,011$ ($p<0.05$)

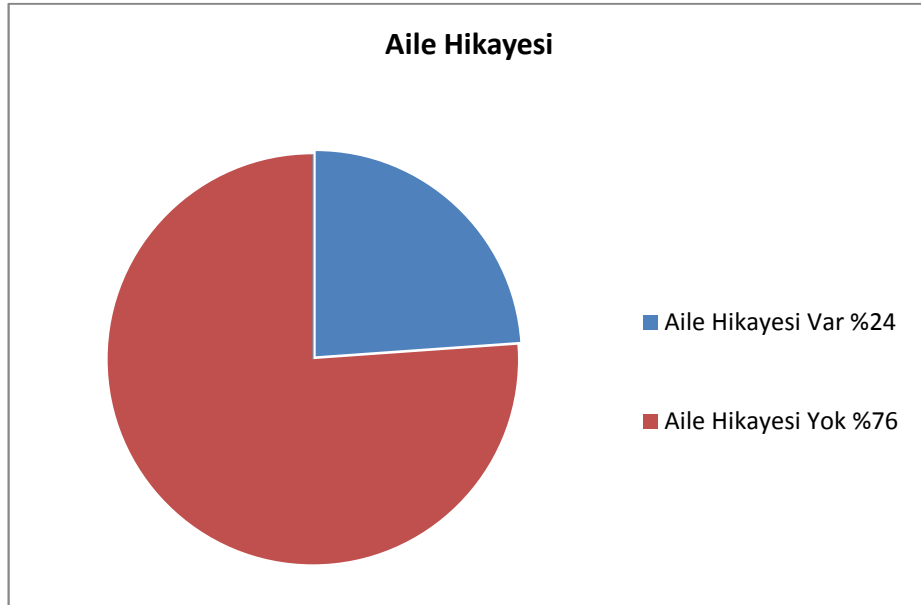
Dirençli nöbet hasta grubunda nöbetlerin başlangıç yaşı ortalama 6 ay iken bu ortalama ilaveten OB olan hasta grubunda 15,5 aya kadar çıkmaktadır (Tablo 11). Ki kare testine göre 2 grup arasında nöbet başlangıç yaşları açısından anlamlı bir fark bulunmuştur.

Tablo 12: Aile hikâyesi durumu.

Grup	Olgu Sayısı	Aile Hikâyesi	%
Dirençli Nöbet	26	Var: 8	%31
		Yok: 18	%69
Nöbet ve OB	22	Var: 6	%24
		Yok: 16	% 76
OB	19	Var: 2	%10,5
		Yok: 17	%89,5

p=0,321 (p>0,05)

Hasta gruplarında aile hikâyesi sorgulandığında ilk hasta grubunda (DN hasta grubu) olguların %31’inde ailelerinde en az bir bireyde epilepsi hikâyesi varken 2. grupta (OB+Nöbet grubu) bu oran %24, 3.grupta (OB grubu) ise %10,5’dir. Ki-kare testine göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır(Tablo 12).



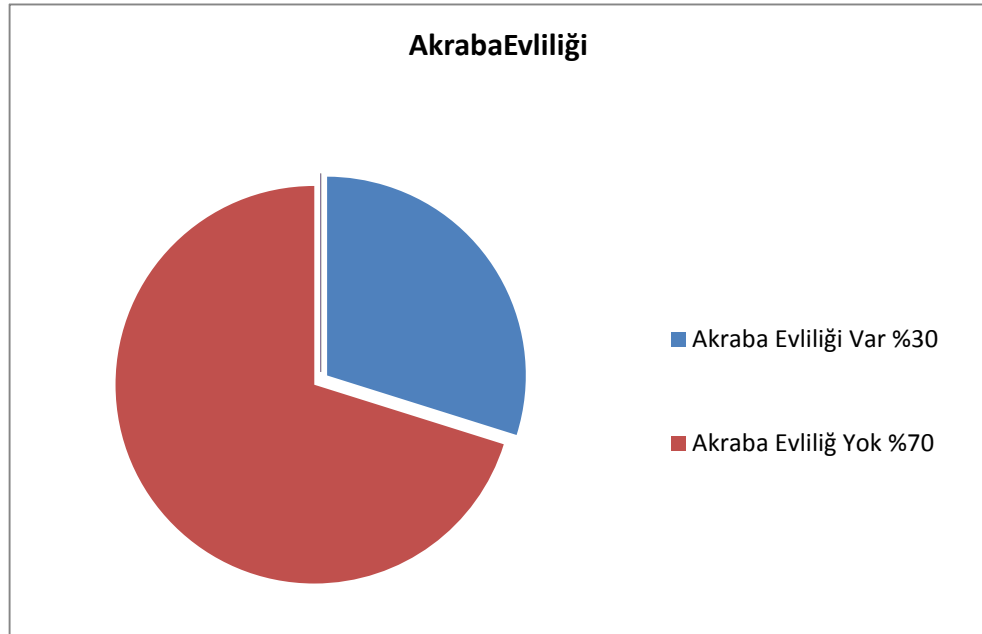
Şekil 27: Hasta gruplarında aile hikâyesi oranı

Tablo13: Hasta gruplarında akraba evliliği hikâyesi karşılaştırılması.

Grup	Olgu Sayısı	Akraba Evliliği	%
Dirençli Nöbet	2	Var: 10	%38,5
		Yok:16	%61,5
Nöbet ve OB	22	Var: 9	%41
		Yok: 13	%59
OB	19	Var: 1	%6
		Yok:18	%94

p=0,020 (p<0,05)

1.grupta olguların ebeveynleri arasında akraba evliliği oranı %38,5, 2.grupta %41 iken 3.hasta grubunda bu oran %6 bulunmuştur. Ki-kare testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Tablo 13).



Şekil 28: Hasta gruplarında akraba evliliği oranları

Tablo 14: 2 grup arasında MR anormalliğinin karşılaştırılması

Grup	Olgu Sayısı	MR Bulgusu	%
Dirençli Nöbet	26	Normal: 8	%30
		Anormal:18	%70
Nöbet ve OB	22	Normal:17	%77
		Anormal:5	%23

p= 0,02 (p<0.05)

1.hasta grubunda olguların 8'inin MR görüntülerinde anormallik varken (BOS mesafelerinde artış, ventriküllerde ılımlı dilatasyon, corpus collosumda incelleme, epilepsiye sekonder atrofiler gibi) 2.grupta 17 hastanın MR görüntüleri normal bulunmuştur.

Tablo 15: EEG bozukluğunun karşılaştırılması

Grup	Olgu Sayısı	EEG Bulgusu	%
Dirençli Nöbet	26	Var: 26	%100
		Yok: 0	%0
OB	19	Var: 4	%21
		Yok: 15	%79
Nöbet ve OB	22	Var: 21	%95
		Yok: 1	%5

p<0.001

DN hasta grubunda olguların tamamında, OB grubunda %21'inde, OB ve nöbet grubunda ise %95'inde elektro fizyolojik çalışmalarda anormallik tespit edilmiştir. Ki-kare testine göre ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Tablo 16: Gruplar arasında politerapi karşılaştırması

Grup	Olgu Sayısı	Politerapi	%
Dirençli Nöbet	26	Alıyor:26	%100
		Almıyor:0	%0
Nöbet ve OB	22	Alıyor:16	%73
		Almıyor:6	%27

p=0.06(p>0.05)

İlaç tedavisi yönünden DN ve Nöbet ve OB grubunda politerapi yani 2 ve üzeri AEİ kullanımı yönünden ki-kare testine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. (Tablo 16).

Tablo 17: Hasta gruplarında mental durum

Grup	Olgu Sayısı	Mental Durum	%
Dirençli Nöbet	26	Normal 2	%8
		Hafif -	-
		Orta 4	%15
		Ağır 20	%77
Nöbet ve OB	22	Normal -	-
		Hafif 3	%13
		Orta 4	%18
		Ağır 15	%69
OB	19	Normal 3	%15
		Hafif 6	%31
		Orta 5	%27
		Ağır 5	%27

Hastaların mental durumları açısından yapılan incelemelerde DN nöbet grubunda hafif zeka kusurlu hastaya rastlanmazken ağır zeka kusurlu hasta oranı %77' dir. OB ve nöbet grubunda mentalitesi normal hasta yokken ağır kusurlu hasta oranı %70 civarındadır. OB grubunda ise zeka etkileşim düzeyleri birbirine yakın bulunmuştur (Tablo 17).

Tablo 18: OB grubu hasta verileri

Otistik Bozukluk Grubu			%
n (Olgu Sayısı)		19	%100
Cinsiyet	Erkek	16	%84
	Dişi	3	%16
Yaş Ortalaması		6,8 ± 2,6	
Özel Eğitim Durumu	Alıyor	16	%84
	Almıyor	3	%16
İlaç Tedavisi	Alıyor	12	%63
	Almıyor	7	%37
Eşlik eden bulgular	DEHB	6	%31
	Saldırganlık	1	%7
	DEHB+ Saldırganlık	6	%31
	Sözel iletişim		
	Yok	13	%68
	Regresyon	6	%34

Tablo 19: Otizmin ilk fark edilme ve tanısı (ay)

Olgu sayısı	İlk fark edilme (ay)	İlk tanı (ay)
19	24 (20-30 ay)	36 (24-42 ay)

p<0,001

Otizm hasta grubunda olguların %84'ü erkek, %16'sı dişiydi. Yaş ortalaması 6,8±2,6. Hastaların bulgularının ilk fark edilme yaşı 24 ay, ilk tanı yaşı ortalama 36 ay civarında idi. Otizme eşlik eden bulgular arasında dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu (DEHB) %31, saldırganlık %7, stereotipi %31 ve DEHB+saldırganlık %31 bulundu. Hastaların %84'ü özel eğitim alırken %16' sı özel eğitim almıyordu. %63 hasta halen en az bir ilaç kullanırken %37 hasta ilaç tedavisi almıyordu.

Tablo 20: Hasta bulguları (değişiklik bulunan hastalar için)

Bulgular	Hasta 1	Hasta 2
Mutasyon	c.525A>T	c.539C>T
Fenotip	RTT Sendromu	ISSX-2
Cinsiyet	K	K
Yaş	7	1.5
Normal pre/perinatal dönem	İVF gebelik üçüz eşi diğer iki fetüs 6 haftalık iken intrauterin ex	Normal
OFC(Doğumda)	34 cm(50p)	?
OFC(Gelişme ile azalan)	50 cm(50p)	1.5 y' da 43cm (<3p)
Nöbet Başlangıç Yaşı	15 gün	15 gün
İnfanıl spazm/EE	+	+
Takibinde Nöbet Şekli	Myoklonik	Tonik
EEG- Başlangıç		Keskin dalga, zemin ritmi düzensizliği
EEG- Takibinde	Her 2 hemisfer FT, FC, CP bölgelerden kaynaklanan ve tüm hemisfere yayılan diken dalga ve multiple diken dalga aktivitesinin varlığı ve kısmi supresyon paternlerinin varlığı ile karakterize	Burst supresyon paterni, hipsaritmi ile uyumlu
İnteriktal EEG	Normal	Normal
Terapi	Politerapi	Politerapi
Otistik bulgular	+	-
Mental retardasyon	+ (Ağır)	+ (Ağır)
Göz teması	-	-

El stereotipisi	+	+
Hipotoni	+	+
Gelişme Geriliği	+	+
Bruksizm	+	-
Uyku bozukluğu	+	+
Konuşma yeteneği	-	-
Yürüme-Yardımlı/Yardımsız	+ (Yardımlı)	-
Oturma-Yardımlı/Yardımsız	+ (Yardımlı)	-
Otonomik Bulgular	-	-
MRI	N	N
AEİ Dirençli Nöbet	+	+
Regresyon	+	+
MECP2 mutasyonu	?	-

FT: Frontotemporal, CP: Sentroparietal, K: Kız, FC: Frontosentral, ?: Bilinmiyor

Tablo 21: Hastalarda bulunan değişikliklerin karakteristikleri

	Hasta 1	Hasta 2
Cinsiyet	K	K
Mutasyon		
Lokalizasyon	Exon 8	Exon 8
Tipi	Missense	Missense
Patojenik/Nonpatojenik	Patojenik	Patojenik
Kodon değişimi	AGA-AGT	CCA-CTA
Aminoasit değişimi	Arg175Ser	Pro180Leu
Nükleotid değişimi	c.525A>T	c.539C>T
Protein değişimi	R175S	P180L
Bölge	Katalitik	Katalitik
Kalıtım	B	B
Yeni/Tekrarlayan	T	T
Önceki Yayınlar	Tao et al	Archer et al.

K. Kız, Arg-R:Arginin, Ser-S:Serin, Pro-P:Prolin, Leu-L:Lösin, B:Bilinmiyor
T:Tekrarlayan

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada sağlıklı kontroller ile infantil ve erken çocukluk döneminde dirençli nöbet, otistik bozukluk ve otistik bozukluğa ilave nöbet tanısı almış çocuk hastaları CDKL5 geninin belli bazı mutasyonları açısından analiz edilmiştir. Araştırma başındaki varsayım; daha önceki literatür bilgilerine uygun olarak bu üç hasta grubunda da belirlenen mutasyonları bulmaktır. Özellikle infantil dönemde erken başlangıçlı epileptik nöbetleri olan hasta grubunda daha önce yapılan çalışmalar CDKL5 geni için de taramaların yapılması gerekliliğini işaret etmekteydi. Ayrıca daha önceki raporlanan vakalarda belli bir süre sonra otistik bulgularında ortaya çıkması otistik bozukluklu çocuklarda da bu genin mutasyonlarına rastlanabileceği konusunda fikir vermiştir.

Bu çalışmanın en önemli bulgusu daha önceden erken dönemde epileptik nöbet geçiren, infantil spazm bulguları olan ve/veya Rett Sendromu fenotipiyle örtüşen bulguları olan fakat Rett Sendromu olarak tanımlanamayan hastalarda literatüre de uygun olarak, belirlenen CDKL5 geninin bazı mutasyonlarının pozitif bulunmasıdır. Öte yandan varsayımların aksine otistik bozukluk ve otistik bozukluk ve nöbet grubunda ise bu mutasyonlara rastlanmamıştır.

Araştırmada 26 kişilik dirençli nöbet hasta grubunda 2 hastada mutasyona rastlanmış olmakla birlikte diğer hasta gruplarında ve kontrol grubunda belirlenen mutasyonlara rastlanılmamıştır.

CDKL5 geni ile ilgili ilk çalışmalar 1998 yılında başlamıştır. Bu yılda Montini ve arkadaşları daha sonradan adı cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) olarak bilinecek

olan STK9 (serine/threonine kinase 9) adında, Xp22 bölgesinde 20 ekzondan oluşan yeni bir gen tanımlanmıştır. Başlangıçta 20 ekzonlu olduğu belirtilen bu gen daha sonra bulunan ve untranslated yani çevrilmeyen bölge olduğu gösterilen ilave 2 ekzonla birlikte toplam 23 ekzondan ibarettir.

Bu araştırmada Montini ve arkadaşları Xp22 bölgesinde eksprese edilen STK9 genini pozisyonel klonlama yöntemi ile izole etmişlerdir. Sekans analizi ile hem memelilerden hem de uzaktan akraba türlerden bazı serin-treonin kinaz genleriyle benzerlikleri ortaya çıkarılmış ve bu gene Serin-Treonin Kinaz 9 (STK9) adını vermişlerdir.

Ökaryotik protein kinazlar homolog protein kinazların geniş bir süper familyasını temsil ederler. *Protein serin-treonin kinazlar* ve *protein tirozin kinazlar* olarak 2 alt grubu vardır. STK9 oldukça iyi korunmuş kinaz alanı ile karakterize, protein serin-treonin kinaz alt ailesi içinde yer almaktadır. Kinaz alanı *KKIAMRE* ve *KKIARLE* proteinleri ile sıkı bir ilişki içinde ve bu proteinler STK9'un öngörülen protein ürünü ile en yüksek benzerliği gösteren proteinlerdir. Bunlar *mitojen aktive edici protein (MAP) kinaz* ailesindendir. *KKIAMRE MEK1 (MAP kinaz aktive edici protein kinaz 1)* tarafından fosforile edilmektedir. Bu olayda STK9'un fonksiyon görebilmesi için fosforilasyonun önemini göstermektedir (78).

STK9' un genetik hastalıklarla ilişkisi Montini ve arkadaşları tarafından 1998 yılında serin-treonin kinazların daha önceden bilinen hastalıklarla ilişkisi üzerinden kurulmaya çalışılmıştır. Serin-treonin kinazlar genetik hastalıkların patogenezinde oldukça sık yer almaktadırlar. Coffin-Lowry ve Peutz-Jegher sendromunda Xp22 bölgesinde serin-treonin kinazları içeren mutasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca Nance-Horan Sendromu, Oral-Fasial-Dijital Sendrom tip 1 gibi bazı hastalıklarla ilgili genler de bu bölgede tanımlanmıştır. 2003 yılında Kalscheuer ve arkadaşları ilk kez X' e bağlı infantil spazm, hipsaritmi ve ciddi mental retardasyonu olan, birbirinden bağımsız benzer fenotipli iki kız hastada X kromozomu üzerindeki p22.3 bölgesini de içine alan ilki 6, ikincisi ise 7. kromozomlar arasında oluşan dengeli bir translokasyon sonucu STK9 geninin etkilendiğini bulmuşlardır. Bu iki hastada da benzer bulgular dikkati çekmektedir. Erken başlangıçlı ciddi infantil spazm, EEG'de hipsaritmi, şiddetli mental retardasyon bu iki hastanın belirgin özellikleridir. Dirençli nöbet grubunda mutasyon bulunan iki hastada da benzer klinik ve elektrofizyolojik bulgular mevcuttu. Bu araştırma CDKL5 geninin ilk kez ciddi nörolojik hastalıklarla bağlantısını ortaya koyması açısından oldukça önemlidir. X' e Bağlı Infantil Spazm Sendromunda (ISSX-2) diğer adıyla X' e

Bağı West Sendromunda vakaların çoğunluğu sporadiktir, az bir kısmı ise familial vakalardır. Araştırmada mutasyon tespit edilen vakalarda sporadikti. ISSX-2'nin daha önceden yapılan çalışmalarda ARX (aristaless-related homebox gene) geninde mutasyonlar sonucu oluştuğu bildirilmiştir. Kalscheuer ve arkadaşlarının tanımladığı kromozomal yeniden düzenlenmeler sonucunda her 2 hasta STK9 genini de içine alan bir bozukluk göstermekteydiler. Bu hastalar klinik olarak ISSX-2 bulguları taşıyorlardı ve ikisinin de bulguları oldukça benzemektedir. Her 2 hastada da ARX geninde ekspresyonun normal olması ve mutasyonun olmaması araştırmacılara ISSX'in etyolojisinde STK9 protein fonksiyon kaybının da rol alabileceğini düşündürmüştür fakat bu yönde güçlü kanıtlar sunamamıştır. Bu dönemde epilepsi fenotipi ile de STK9 arasında ilişki kurulmaya çalışılmışsa da buna yönelik kanıtlar ikincil düzeyde kalmıştır.

Bu bilgiler ışığında 2004 yılında Scala ve arkadaşları Rett sendromu varyantı (Hanefeld varyant) bulguları taşıyan, erken başlangıçlı konvülsyon hikayesi olan 2 kız hastada CDKL5 mutasyonu analizi yapmışlardır. Bu çalışmada hangi hastalarda CDKL5 mutasyonu analizi yapılacağı belirlenirken ISSX ve Rett Sendromu varyantının klinik bulgularının örtüştüğü bilgisinden yola çıkılmıştır. Her iki hastada da ilaç tedavisine dirençli, erken dönemde (doğumdan sonra 10. gün ve 45. günde) başlayan nöbet, genel hipotoni, el becerilerin kaybı ve stereotipik el hareketleri mevcuttu. Hastalardan ilkinde korunmuş kinaz bölgesinde 4 bp'lik bir delesyon bulundu ve bu delesyonun proteinin katalitik fonksiyonunu bozduğu anlaşıldı. Daha önceki bilgiler CDKL5 proteininin fonksiyonel kaybının ciddi ISSX-2 nedeni olduğu yönünde idi (71). Diğer hastada c.2535_2536 delesyonu tespit edildi. Araştırmada kontrol ve hasta grubunda hiçbir vakada bu mutasyonu tespit edemedik. Bu araştırmanın önemi infantil spazmlı Rett Sendromunun atipik formunun CDKL5 geninin inaktivasyonuna bağlı olabileceği görüşünün ilk kez belirtilmesidir. Yine bu çalışmada MECP2 ve CDKL5 genlerinin aynı yolağa ait olabileceği ve MECP2'nin CDKL5 tarafından fosforile edilebileceğinden bahsedilmiştir. Araştırmadaki 1 no' lu hasta Scala ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi erken başlangıçlı (doğumdan sonra 15.günde) dirençli nöbet hastası ve aynı zamanda Rett Sendromu bulgularını da taşımaktaydı. Yani genel hipotoni, el becerilerinde kayıp, stereotipik el hareketleri gibi bulguları mevcuttu.

Tao ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada 2 yeni mutasyon tespit ettiler. Bunlar monozygot ikizdiler. İlkinde doğumdan sonra 5. haftada başlayan epilepsi nöbeti mevcut olup, klinik bulguları ile atipik Rett Sendromu tanısı almış bir vakaydı. 2. vaka

ise çalışmada da araştırılan ekzon 8 c.525A>T mutasyonu taşıyan vaka idi. Burada arjinin aminoasidinin serine dönüşümü söz konusudur (R175S). Mutasyona uğrayan aminoasitlerin uygun kinaz fonksiyonu için kritik önemleri bulunmaktadır. Arg175 kinaz subdomain 8'de bulunmakta ve substrat tanıma için oldukça önem taşımaktadır. (168).İkizlerden ilkinde 2 aylıkken infantil spazm gelişmiş olup şiddetli psikomotor gerilik, hipotoni, konuşma yokluğu, destekli/desteksiz yürüyememe, stereotipik el hareketleri gibi ciddi bulgular mevcut iken diğerinde ise daha az ciddi bulgular vardı. Bu hastanın sözel becerileri korunmuş ve belirgin motor defisiti yoktu ve hafif MR'li otistik fenotip daha baskındı. Hastaların her ikisinin de beyin görüntülemeleri, oftalmolojik ve işitme testleri normaldi. Buradan da anlaşılacağı üzere CDKL5 mutasyonluların fenotipi heterojenite gösterebilmektedir. Fenotipik heterojenitenin kızlarda değişken X kromozom inaktivasyonuna (XCI) bağlı olabileceği düşünülmektedir (72). Bunu destekleyen bulgu olarak en ağır fenotipin normal X kromozomunun tamamen inaktivasyona uğradığı Kalscheuer ve arkadaşları tarafından raporlanan X; otozomal kromozom translokasyonlu kız hasta gösterilmiştir. Fakat ikizlerde kliniğin birbirinden farklı olmasına rağmen periferik kan hücrelerinde benzer XCI bulunması bu hipotezi desteklememektedir. Buna göre periferik kan hücrelerindeki XCI beyin hücrelerindeki yansıtmamaktadır denilebilir. Araştırmamızda XCI ile ilgili herhangi bir analiz yapılamamıştır. Araştırmada bulunan değişikliklerden bir tanesi Tao ve arkadaşlarının bulmuş olduğu değişiklikle aynıdır. Hastada doğumu takibe 2. haftada morarma, gözlerini bir noktaya sabitleme, sıçrama ve el-kollarında kasılma şeklinde ve AEİ tedavisine dirençli nöbetleri mevcuttu. 4. ay civarında IS gelişti. Bu aydan sonra gerileme başladı. Baş tutamama, destekli veya desteksiz oturamama, stereotipik el hareketleri, otistik bulgular mevcut. Farklı olarak hastada oftalmolojik çalışmada görme kaybı not edilmiştir. Beyin MR görüntülemeleri normaldi. Diğer yandan mutasyon bulunan hastanın 5 yaşında olan ve kendisi ile benzer fenotipik özellikleri taşıyan kız kardeşinde yapılan araştırmada belirlenen mutasyonlar açısından herhangi bir değişikliğe rastlayamadık. Bu da heterojeniteyi ve X kromozom inaktivasyonunu destekleyebilir.

Bu çalışma, daha önceki (Kalscheuer ve arkadaşları ile Scala ve arkadaşları, Weaving ve arkadaşları) çalışmalarda olduğu gibi erken başlangıçlı nöbet hikayesi olan ve Rett varyantı olan vakaların bazılarının CDKL5 mutasyonuna sahip olabileceğini ve klinik bulguların bir heterojenite gösterdiğini vurgulaması açısından önemlidir. Vakalardan

ilkinde Rett Sendromu varyantı (Hanefeld varyantı) diğ erinde ise ISSX-2 (X' e bağı lı infantil spazm sendromu) fenotipi mevcuttu. Bu anlamda literatürdeki vakalarla uygunluk söz konusudur. Aynı zamanda burada Scala ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi MECP2 ve CDKL5 genleri arasında ortak bir patojenik yol olabileceğı ve MECP2'nin fosforilasyonunun artışında CDKL5'in aldığı rol belirtilmiştir.

Weaving ve arkadaşları atipik Rett Sendromu kriterlerine uygun 9 haftalıkken IS geliş en, 10. aya kadar geliş imi normal olan fakat daha sonra gerilemeye başlayan bir hastada CDKL5 c.183delT mutasyonunu tanımladılar. Probandın, Tao ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi monozigot ikizi ve ayrıca daha büyük olan bir erkek kardeşi vardı. Her 3 hastada da yapılan analizlerde tek baz delesyonuna rastlanmış ve bunun patolojik olduğ una karar verilmiştir. İlk hastada yani probandda Rett Sendromu ile örtüş en bulgular ve IS gözlenirken ikizinde Rett Sendromu bulguları yoktu ve otistik bozukluk tanısı konmuş tu ayrıca hiç nöbet gözlenmedi. Bu vaka literatürde CDKL5 mutant fakat nöbet bulgusu olmayan ilk ve tek vaka olarak dikkati çekmektedir. Kardeşleri olan erkek hastada ise ve ş iddetli entelektüel yetersizlik ve tedavi ile kontrol edilemeyen nöbetleri mevcuttu. Bu ailesel vakalarda da görüldüğü üzere CDKL5 mutasyon vakalarının fenotipik heterojenitesi dikkat çekmektedir. Aynı zamanda ailesel nadir mutasyonlu vakalardan bazılarıdır. Bu ailede etkilenmemiş 2 bireyin daha bulunmaktadır. Proband annesinin 1. trimesterde 2 kez gebelik kaybı hikâyesi 1. vakanın annesinin de ilk trimesterde gebelik kaybı yaşamış olması ile benzerlik gösterse de CDKL5 mutasyonunun öldürücü olmadığı yönünde bilgiler mevcuttur. Aynı çalışmada Weaving ve arkadaşları bu sonuçlar üzerine daha önceden Rett sendromu tanısı alan 44 kişilik hasta grubunda tarama yapmış ve 1 hastada yeni bir mutasyon tespit etmişlerdir. (IVS13-1G>A). Bu hasta da aynı şekilde erken dönemde dirençli nöbetleri olan ve IS geliş en bir vakaydı. Bu vakanın üvey kız kardeşinde de klasik Rett Sendromu bulguları vardı. Fakat ne MECP2 ne de CDKL5 mutasyonu için pozitif bulundu. Probandda 2.vaka ile benzer olarak ilaveten hirsutizm bulgusunun olması dikkat çekici olabilir. Bu çalışma da daha önce Tao ve arkadaşlarının çalışmalarını destekler nitelikte olması açısından önemlidir. Atipik Rett veya varyant Rett Sendromlularda MECP2 mutasyonu nadir görülmektedir. Bu hastalar CDKL5 mutasyonu taramaları açısından kuvvetli aday grubunu oluştururlar. Ayrıca neonatal periyotta nörolojik anomalileri olan erkek hastalar ve OSB ve mental retardasyon ile birlikte ciddi nöbet hastası kız çocuklarının CDKL5 mutasyonu açısından araştırılması

tavsiye edilmiştir. Daha önceki çalışmalarında bir sonucu olarak bu iki gen arasında potansiyel bir bağlantının olduğu düşünülmüştür. Bunun için fare beyininde bu iki geninde aynı bölgelerde eksprese olduğu, CDKL5'in MECP2'den bağımsız hareket ettiği ve MECP2 fosforilasyonunu yukarı doğru etkilediği gösterilmiştir. CDKL5'in ekspresyonu ve nükleer transkripsiyonu erken postnatal dönemde uyarılır ve buna paralel olarak epileptik nöbetler ortaya çıkar (169).

Evans ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada MECP2 mutasyonu negatif olan 94 Rett Sendromu veya Rett Sendromu benzeri fenotipli hasta grubunda 3 kız hastada 3 yeni mutasyon tespit edilmiştir. Bu hastalardan ikisinin fenotipide araştırmada olduğu gibi erken dönemde nöbetleri olan Rett varyantı ve birinin de ISSX-2 idi. Varyant Rett Sendromlu hastaların birinde splicing, diğerinde missense, ISSX' li hastada ise splicing mutasyon tespit edilmişti. Bu fenotipik heterojenite daha önceden de vurgulanan X kromozom inaktivasyonunun derecesi ile ilişkili olabilir. Dikkati çeken bir nokta da 3 hastadan ikisinin vagal sinir uyarıcısı ile nöbetlerinin devamlılığında ve sıklığında gözlenen azalmadır. Bu CDKL5 mutasyonunda otonomik bir parçanın olabileceğini göstermektedir. Daha önceki vakalardan yapılan derlemede 9/14 otonomik bulgular olduğu gösterilmiştir. Fakat araştırmamızda otonomik bulgulara rastlanmadı. Evans ve arkadaşları missense mutasyonlu vakaların diğerlerine göre biraz daha hafif bulgular gösterdiğini ileri sürse de hastalığın şiddeti ile mutasyonun yeri arasındaki ilişki halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Archer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 73 hastalık ilk grupta ilk 6 ayda epileptik nöbet hikayesi olan 49 hasta (42 dişi 7 erkek) ve 2. grupta IS hikayesi olan 26 hasta (11 dişi 15 erkek) vardı. İlk gruptaki 7 dişi hastada yeni mutasyonlara rastlanmış olup 2. gruptaki dişilerde ve her iki gruptaki erkek hastalarda daha önceden yayınlananların dışında yeni bir değişikliğe rastlanmamıştır. Burada 73 hastanın 49'unda nöbet başlangıç yaşı 0-5 ay iken, 10 hastada 6-12 ay ve 14 hastada 12 ay altında fakat kesin yaş belli değildi. Mutasyon bulunan 7 hastanın nöbet başlangıç yaş aralığı ise 10 gün-5 ay arasında değişmekteydi. Yani burada nöbet başlangıcı ağırlıklı olarak 6. aydan öncedir. Araştırmada da nöbet başlangıç yaşı AEİ direnci olan grupta ortalama 6 ay civarı (2,75-7,75) idi. OB+nöbet grubunda ise ortalama 15,5 ay (5,75±25,50) idi. Mutasyon bulunan hastaların hiçbirinde anormal MR bulgusu olmaması araştırmamızdaki MR bulguları ile benzerdir. Genel hasta gruplarımızda ise yine benzer şekilde (%70 ve %77) beyin görüntülemelerinde anormalliğe rastlanmadı. EEG bulgusu

olarak, IS'li bir hastada hipsaritmi dışında ortak EEG bulgusuna rastlanmamıştır. ISSX 'li vakada EEG'de hipsaritmi ve burst supresyon paterni dikkati çekmektedir. Archer ve arkadaşlarının bulmuş olduğu değişikliklerden birisi de 2.hastada bulunan c.539C>T (P180L) değişikliğidir. Bu değişiklik proteinin katalitik bölgesinde yer almaktadır. Benzer şekilde bu kız hastada doğumdan sonra ilk ay içerisinde başlayan nöbet söz konusudur. Doğumda baş çevresi normal ve ilerleyen dönemlerde baş çevresinde küçülme olmuştur. Hipotoni mevcut, otonomik bulgular olmamış, el hareketlerinde kısıtlılık ve el stereotipisi vardır. Bu bulgulardan da anlaşılabileceği üzere değişikliklerde çoğunlukla benzer fenotipik bulgular ortaya çıkmaktadır.

Grosso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nöbet başlangıç yaşı median yaş 30 gün (± 7 gün) olarak bulunmuş ve hastaların %46'sında nöbetlerin ilk ay içinde , %26'sında ise ilk hafta içinde ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Pintaudi ve arkadaşlarının çalışmasında ise median yaş 2 ay tespit edilmiştir. Bu tespiti dayanarak CDKL5 mutasyonuna bağlı görülen nöbetlerin yenidoğan dirençli nöbetleri içinde sınıflandırılmasını önerilmiştir. Buradaki bulgulara uygun olarak her iki mutasyonlu hastamızda nöbetlerin başlangıcı doğumdan sonraki ilk 15 gündür. Burada daha önceden yapılan çalışmalara istinaden doğumdan sonraki ilk günde CDKL5 ekspresyonunun en yüksek neokorteks, priform korteks ve medial temporal lob yapıları içinde olduğu ve elektroklinik aktiviteninde bu bölgelerde yoğunlaştığı tespitine de yer verilmiştir. Çalışma gruplarında da EEG anomali saptanan hastalarda her ne kadar spesifik bir EEG bulgusu olmasada aktivitelerin sıklıkla bu bölgelere uyduğu görülmüştür.

Pintaudi ve arkadaşları 2 hastada daha önce literatürde yayınlanmamış 2 değişiklik buldular. Bunlardan birisi proteinin yokluğuna neden olan stop kodon oluşumuyla sonuçlanan ekzonik bir mutasyon iken diğeri proteinin yapısını değiştiren splice site mutasyon idi. İlk vakanın fenotipi 2. vakaya göre daha az şiddetli ve tek AEİ ile nöbetlerin kontrol edilebildiği bir vakaydı. Bu bilgi ile Pintaudi ve arkadaşları hastalığın şiddeti, klinik ve epileptik fenotip ve ilaç cevabı da dahil olmak üzere birtakım kriterlerin mutasyonun yeri ile ilişkili olduğu sonucuna vardılar. Araştırma da hastaların ikisinde de missense mutasyonlar mevcuttu fakat splice site mutasyonlar araştırma içerisinde olmadığı için herhangi bir karşılaştırma yapma olanağı olmadı. Ayrıca burada bilinenin aksine Pintaudi ve arkadaşları sadece ilaç tedavisine dirençli ciddi EEG değişiklikleri olanların değil tedaviye cevap veren hafif formlarında CDKL5

taraması için aday olduğunu söylemişlerdir. Fakat diğer yayınlarda bu görüşü destekleyecek yeterli veri yoktur.

Bahi-Buisson ve arkadaşlarının 210 atipik Rett ve ISSX-2' li kız hastada epilepsi basamaklarını incelediği çalışmada 13 hastada CDKL5 geninde mutasyon tespit edilmiş ve bu hastalardaki bulguların eşliğinde epilepsinin birbirini izleyen 3 aşamada ilerlediği tezi öne sürülmüştür. Buna göre epileptik fenotipin gelişiminde başlangıçta normal bir interiktal yani nöbetsiz dönemlerde normal EEG bulgusu bulunur. Bundan sonraki süreç IS ve EEG' de hipsaritmi dönemidir. Son dönemde ise multifokal ve antiepileptik ilaçlara dirençli epilepsi ortaya çıkmaktadır. Bu görüş araştırmada da benzer şekilde tezahür etmiştir. Hastaların ikisinde de nöbet başlangıçlarında sonra interiktal dönemlerde elektrofizyolojik çalışmalar normal bulgular gösterirken IS gelişiminde 2. hastada Bahi-Buisson'un çalışmasındakine benzer şekilde hipsaritmi ve burst supresyon bulgusu izlenmiştir. Son dönemde epileptik fenotipin bulgusu olarak ta her iki hastada da AEİ dirençli nöbetler görülmüştür. Bu çalışmanın neticesinde CDKL5 mutasyonuna özgü tanısal bir EEG bulgusundan bahsedilemeyeceği vurgulanmış, ayrıca beyin görüntüleme bulgularında da bahsedilmiş olup değişiklik tespit edilen hastalarda posterior beyaz cevher ve nükleus dentatus'ta hiperintens alanlar, myelinizasyonda gecikme ve serebellar atrofi bildirilmiştir. Hastaların hiçbirinde beyinde anormal radyolojik bulgulara rastlanmamış olup literatürde de CDKL5 mutasyonlu hastaların genelinde anormal görüntüleme bulgusu sık rastlanılan bir durum değildir.

Bahi-Buisson'un çalışması mutasyonun yeri ve hastalığın şiddeti açısından da karşılaştırma yapmaktadır. Tespit ettikleri mutasyonlar katalitik bölgede ve/veya subelüler lokalizasyonda idi. Buradaki bulgular katalitik bölgedeki mutasyonların bu bölgenin altındaki değişikliklere göre daha ciddi geç başlangıçlı epilepsi nedeni olduğunu göstermiştir. Yani katalitik bölge içinde veya üzerinde olup Serin/Treonin kinaz aktivitesini bozan değişiklikler daha ciddi fenotiple ilişkilidir. Fakat mutasyonun konumu ve fenotipin şiddeti arasındaki ilişki halen bile tam olarak kurulamamıştır. Daha önce literatürde yer alan mutasyonların %50' sinden fazlası katalitik bölge veya daha yukarısında yer alan mutasyonlardı (Proksimal mutasyonlar) (75). Bunlarda da fenotipin şiddeti ile ilişki net olarak kurulamamıştı. Ancak katalitik bölgede herhangi bir bozukluk olup olmasının mutasyonun tipi ve şiddeti ile ilişkili olabileceği bu çalışmada belirtilmiştir.

Nemos ve arkadaşlarının Rett Sendromu benzeri fenotip, şiddetli ensefalopati, erken başlangıçlı nöbet ve IS' li 177 hastada yaptığı çalışmada, kız hastalarda CDKL5 mutasyon oranı %8 civarında bulunurken hiçbir erkek hastada değişikliğe rastlanmamıştır. Literatürde genel olarak erken başlangıçlı nöbetleri olan çocuklarda CDKL5 mutasyonu oranı %9 civarında bulunmuştur. Erken nöbet ve IS fenotipinde ise bu oran %28' e çıkmaktadır. Araştırmada bu oran %9 civarında idi. (n=26) Bu çalışmada mutasyonların daha önceki çalışmalara da dayanarak serin/treonin kinazın katalitik bölgesine benzer ilk 11 ekzon üzerine yayıldığı belirtilmiştir. Neticede örnek olarak MECP2 gibi hedef proteinlerin fosforilasyonu ve proteinin otofosforilasyonu bozulmaktadır. Değişikliklerin ikisi de ekzon 8'de katalitik bölgede ve missense mutasyonlardı. Her iki mutasyonda da farklı aminoasitler ortaya çıkmıştır yani patojenik mutasyonlardır.

Çeşitli çalışmalarda da belirtildiği üzere CDKL5 mutasyonları kız hastalarda erkeklere göre çok daha sık bulunmuştur. Bulunan mutasyonların %86,5'i kızlarda iken ancak %16,5'i erkek hastalardadır (7). Hasta gruplarındaki toplam 40 erkek hastanın hiçbirinde değişiklik tespit edilememiş olması bu görüşü desteklemektedir. Liang ve arkadaşlarının sadece epileptik ensefalopatili, her iki cinsiyetten eşit sayıda hastada yaptıkları çalışmada CDKL5 mutasyonunun oranını kızlarda % 14, erkeklerde %5 bulmuşlar ve bulguların şiddetinin erkek ve kız hastalarda aynı olmasından dolayı taramaların erkeklerde de yapılması gerektiğini işaret etmişlerdir. Klinik fenotipin geniş olması yani atipik Rett Sendromu, ISSX-2, EIEE-2, mental retardasyon ve otizm fenotiplerinin bu gen değişiklikleri ile olan ispatlanmış ilişkileri nedeniyle, her ne kadar cinsiyet bağımlı gibi düşünülse de neonatal dönemde yukarıdaki fenotipe sahip erkek hastaları da tarama içine almak gerekliliğini ortaya koymaktadır. Erkek ve dişilerde mutasyon oranları arasındaki fark basitçe dişilerde bulunan 2. X kromozomu ile açıklanmaktadır (170).

Bahi-Buisson ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışma yine Rett Sendromu benzeri fenotip, IS ve ilaç AEİ direnci olan bir grup hastayı içermekteydi. 183 hastalık bu çalışmada 7'si yeni olmak üzere toplam 18 mutasyon 20 farklı hastada bulunmuştu. Bu da % 10 civarında bir orana karşılık gelmektedir. Literatür bilgileri erken başlangıçlı nöbeti olan kız çocuklarında CDKL5 geninde mutasyon sıklığı tahminen %9 iken, erken başlangıçlı nöbet ve infantil spazmlı kız çocuklarında ise bu oran %28 olduğunu gösterir (7). Nöbet başlangıcı erken (6 ay civarında) olan dirençli nöbet grubu

hastalarıda bu oranı % 8 bulundu. (n=26) Bu 20 hastanın yaş ortalaması 4,5 (1,5–26), tüm vakalarda nöbet başlangıç yaşı ilk 3 aydı ve hipotoni ile birlikte gelişme geriliği ile geliyorlardı. Mutasyon bulunan vakaların yaşları ise 7 ve 1,5 idi. Nöbet başlangıçları ise doğumdan sonraki ilk 1 aydı. %55 ‘inde baş çevresinin büyümesinde gerileme, bunlarında yarısında göreceli mikrosefali tespit edilmişti. İlk hastanın doğumda baş çevresi 50 persentil ve ilerleyen yaşlarda da herhangi bir gerileme tespit edilmemişti. Diğer hastada ise doğumda baş çevresi ile ilgili bilgi yoktu ve en son 15. ayda 43 cm yani 3 persentilin altında idi. Değerlendirme anında hastaların %75’ inde AEİ tedavisine rağmen devam eden nöbetler söz konusuydu. Mutasyonlu hastaların da bu yönden bu çalışma ile benzerliği bulunmaktadır. İlk hastada 5, ikincisinde ise 3 AEİ tedavisine rağmen nöbetlerinde kontrol sağlanamamıştır. Bu tür hastalarda prognoz olumsuzdur. Bir müddet tedavi ile balayı dönemi denilen dönem olsa da (1-30 ay) multiple AEİ tedavisine rağmen nöbetler mutlaka tekrarlar.

Araştırmadaki en önemli noktalardan olan otistik bulgular Bahi-Buisson’ un çalışmasında hastaların %85’inde mevcuttu. Bunlar azalmış sosyal aktivite, zayıf göz teması, göz odaklanmasında azalma gibi bulgulardır. İlk hastada 10. aydan sonra gelişen benzer bulgular araştırma ile desteklenmiştir. %85 hastada, ortalama 2,5 yaşında gelişen el stereotipisi, %40 hastada ise bruksizm vardı. Bu iki bulgu en sık görülen stereotipik bulgular olup ilk hastada 1 yaşından sonra ortaya çıktı, ikincisinde ise sadece 15 ay civarında el stereotipisi tespit edilmişti. Değişiklik bulunan sadece bir hasta yardımsız yürüyebiliyormuş. Bu hafif fenotip normal X kromozomunun çoğunluğunun beyinde aktif kaldığını desteklemektedir fakat çalışmada XCI ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Vakalar diğer çalışmaların çoğunda olduğu gibi ailesel olmayan yani sporadik vakalardı. 3 hasta grubunda %69 ile %90 oranında vakalar sporadik ve mutasyon bulunan iki hastanın birinde kardeş öyküsü olmasına rağmen bulunan bir değişiklik yoktu, diğerinde ise aile hikayesi yoktu.

CDKL5 mutasyonlu hastaların epilepsi nöbetleri göz önüne alındığında yapılan çalışmada hastaların %75’inde nöbetlerin dirençli bir şekilde devam ettiği, geriye kalan %25’inde progresif olarak azalan bir nöbet bulgusu olduğu dikkat çekmektedir. Mutasyon bulunan her iki hastada politerapiye rağmen halen devam eden nöbetleri mevcuttur.

White ve arkadaşlarının yaptığı 316 hastalık çalışma CDKL5 için yapılan en geniş hasta grubunu içeren çalışmadır. Burada 102’si Rett fenotipi benzeri, 52’si West Sendromu,

33'ü epileptik ensefalopatili, 59'u OSB'li ve geri kalanları da entelektüel yetersizlikli nöbeti olan veya olmayan hastalar seçilmiştir. Bunlarda 4'ü yeni olmak üzere toplam 7 değişiklik tespit etmişlerdir. Tespit edilen değişikliklerden birisi C terminal bölgede yer almaktaydı. Şimdiye kadar katalitik bölgedeki değişikliklerin öneminden bahsedilse de C terminal bölgenin proteinin hücre içi lokalizasyonundaki rolü önemlidir. Kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde de bu bölge çok önemlidir. Eğer değişiklikler C terminal bölgede olursa prematüre stop kodon oluşumu meydana gelir ve herhangi bir aminoasit sentezi gerçekleşemez. C terminalin olmadığı CDKL5 trunkasyon protein oluşumunda ise protein konfigürasyon değiştiremez, katlanamaz ve fonksiyonunu yitirir, sitoplazma ve nükleus arasında CDKL5'in trafiği olumsuz etkilenir. Yine de katalitik bölge mutasyonlarına nazaran daha hafif klinik gösterirler (77). Araştırmada C terminal bölgesindeki bir adet frameshift ve bir adet missense mutasyonu tarama imkanı oldu, hasta ve kontrol gruplarında hiçbir bireyde bu iki mutasyona rastlanmadı.

Mei ve arkadaşları 49 hasta üzerinde önce DNA sekans analizi yapmışlar ve 3 hastada frameshift ve 1 hastada missense olmak üzere 4 mutasyon tespit etmişlerdi. Daha sonra geri kalan 45 hastaya multiplex ligation dependent probe amplification assay (MLPA) ve Custom Array-comperative genomic hybridization (CGH) uygulamışlar ve Xp22. 3 bölgesinde 4 adet büyük genomik delesyon tespit etmişlerdi. Toplamda 49 hastanın 8'inde (%17) değişiklik bulunmuştur. Bu hastalarda CDKL5 ile birlikte SCML2, RS1, PPEF1, PHKA2 ve GPR64 genleri de delesyona uğramıştır. Hastaların fenotipleri literatürde yayınlanan diğer mutasyonlu vakalardan farklı değildi. Sadece nöbet başlangıç yaşları daha erken bulundu. Bu bulguyu genetik açıdan açıklamak için bilgiler tam yeterli değildir. Buna rağmen şu ortaya çıkabilir; değişiklik tespit edilemeyen fakat fenotipik olarak CDKL5 mutasyonu düşündüren vakalarda MLPA ve CGH teknikleri ile gross delesyon ve dublikasyonları tespit edilebilir. Bu bilgiyi destekler bir çalışma da Bartnik ve arkadaşları tarafından yapılmış ve birisi erkek toplam 3 hastada CGH ile mozaik ekzonik delesyonlar tespit edilmiştir. Bu çalışmada daha önceki bilgilerin aksine (73) CDKL5 mutasyonlarının in utero dönemde erkek cinsiyette öldürücü olabileceği ve neticesinde heterozigot kadınların mutasyon taşıyan veya delesyonlu erkek fetüslerinin daha doğmadan fetal dönemde kaybedildiği belirtilmiştir. Erkeklerde mutasyonun çok nadir görülmesi ve CNV delesyonlarının düşünülen az olması Bartnik'in çalışmasında bu şekilde açıklanmaktadır.

İntusoma ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile CDKL5 gen taramalarının klinik duyarlılığını incelemişlerdir. Burada daha önce yapılan çalışmalarda Rett sendromu fenotipi gösteren vakaların seçildiğini, sonuçların genotip-fenotip korelasyonu oluşturmaya yeterli olmadığını, bu kriterlerine ilaveten Rett sendromu fenotipi olmayan hastalarda da değişikliklerin bulunduğu ve klinisyenlere yardımcı olmak açısından testlerin klinik duyarlılığının belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir. Duyarlılık cinsiyet, nöbet tipi, başlama yaşı veya çalışmaya dahil edilme kriterlerine göre değişiklik gösterebilir. MECP2 negatif Rett Sendromlularda CDKL5 mutasyonlarının tarama duyarlılığı %8 civarındaydı. Yani 100 tane kriterlere uyan hastada tarama yapılırsa en az 8 tane patojenik CDKL5 mutasyonu bulunmalıdır. Bu çalışmada ise epileptik ensefalopatili kız hastalarda duyarlılık, başlangıç yaşı ve IS veya Rett benzeri bulguların eşlik etmesine göre değişmektedir. Başlangıç yaşı ele alındığında (<12 ay, <6 ay, <3 ay) sırasıyla duyarlılık oranları %4,3, %11,6 ve %14,3 olarak bulundu. Rett benzeri fenotipin eşlik ettiği durumlarda ise bu oran %31'e kadar çıkar (171). Araştırmada hastaların ikisinin de başlangıç yaşı 3 ayın altında idi ve Rett benzeri fenotipleri mevcuttu. Fakat duyarlılık oranı bu çalışmaya göre daha düşük bulundu. Klinik duyarlılığın önemi genetik testlerin maliyetlerinin yarattığı tereddütlerdir. Buna göre CDKL5 mutasyonu için tarama kriterleri 6. aydan önce başlayan nöbetleri ve Rett fenotipi benzeri bulguları olan kız hastalar olarak düzenlenebilir.

Artuso ve arkadaşlarının klasik Rett sendromu ile varyantlarını karşılaştırdığı çalışmaya dahil edilen 9 CDKL5 mutasyonu pozitif hasta ile klasik Rett, Zappella varyant ve Hanefeld varyantlı hasta grupları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada nöbet başlangıç yaşlarına, hastaların bulgularının varlığı veya yokluğuna (baş çevresi, prenatal hikaye, stereotipik hareketler, psikomotor gelişim, epilepsi, otonomik bulgular vb. bulgular) göre skorlama oluşturularak değerlendirme yapılmıştır. CDKL5 mutant hastaların bu gruplar içinde bazı bulgular yönünden Zappella varyant Rett Sendromlularla benzer skorlara sahipken genel olarak klasik Rett Sendromu ile benzer median değerlere sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma aynı zamanda erken başlangıçlı Rett varyantının tanı kriterlerinden de bahsetmektedir. Bu form MECP2' nin negatif, CDKL5 'in mutant olduğu formdur. Buna göre baş çevresinde, ilerleyen yaşlarla birlikte azalma olması zorunlu kriter olmaktan çıkıp destekleyici bir kriter olarak değerlendirilmektedir. Araştırmada da görülen normal prenatal dönem, şiddetli hipotoni, el stereotipisi, şiddetli

psikomotor gelişim geriliği, hayatın ilk haftası ile 6. ay arasında ortaya çıkan epilepsi zorunlu kriterler arasında sayılmıştır.

Araştırmanın amaçlarından biriside başlangıçta belirtildiği gibi CDKL 5 gen değişiklikleri olan hastalarda otistik bulguların varlığından dolayı otizm etyolojisinde CDKL5 geninin de rol oynayabileceği düşüncesi idi. Çalışmada otistik bozukluklu hastaların hiçbirisinde beklenen değişikliklere rastlanılmadı. OSB, 5 farklı durumu içeren bir hastalık grubudur. Bunlardan en sık görüleni otistik bozukluktur. Hayatın ilk 3 yılı içerisinde başlayan, etkileşim ve iletişimde belirgin gecikmeler ile karakterizedir.

Araştırmaya dahil edilen OB' li olguların %84'ü erkek, %16' sı kız, erkek/kız oranı 5,3 idi. Literatürde de erkeklerde otizmin daha sık olduğu belirtilerek E/K oranı olarak 3,5-4/1 bildirilmektedir. Bu açıdan oran literatür ile uyumludur. Araştırmada 19 hastanın 13' ünde (%68) hiç konuşma olmamışken 6' sında (%32) ise belli bir döneme kadar çok az da olsa dil gelişiminin olduğu fakat daha sonra bunun gerilediği bildirilmiştir. Normal gelişen çocuklarda ortalama 5-6. ayda agulama, 8-9 aylıkken heceleme, 1 yaşında ise anlamlı tek kelimeler ve 2 yaşında iki kelimeli cümleler başlar. Otistik çocukların %50-75'inde bu basamakların hiçbirisi belirtilen zamanlarda gerçekleşmez. Vakaların yaklaşık %25'inde ise 8-18 ayda konuşma basamakları başlar, ancak bu dönemden sonra duraklama ya da gerileme gözlenir (172). Araştırmada rastlanılan en sık bulgu olan dil gecikmesi ve konuşmama bulgularının literatür ile uyumlu olduğu ve vakaların büyük kısmında dil gelişim basamaklarının hiç gelişmediği, gelişenlerde ise bir süre sonra gerilediği tespit edilmiştir.

Otizmin ilk fark edilme yaşı araştırmada ortalama 24 ay civarı (20-30 ay) iken, ilk tanı yaşı ortalama 36 ay (24-42 ay) idi. Aile ilgisi yüksek ise hayatın ilk 1 yılı içerisinde otizmin tanınabileceği, tersi durumda ise bu sürenin uzadığı belirtilmiştir (173). Literatürde ailelerin %80' inin bu çocukları yaklaşık 24. ay civarında dil gelişiminin bozukluğu ve konuşma gecikmesi ile fark ettikleri bildirilmiştir (174). Diğer bir bilgi ise ilk fark edilme ve ilk tanı yaşı arasında yaklaşık 13 aylık bir gecikmenin olması ve bu farkın hastalığın derecesi ile ilişkili olduğu, daha ciddi durumların daha erken tanındığı bilgisidir (175). İlk fark edilme, ilk tanı yaşı ve ikisi arasındaki fark (araştırmada 12 ay) bilgileri açısından araştırma literatür ile uyumludur.

Otistik bozukluklu çocukların zeka seviyeleri incelendiğinde bunların yaklaşık %60' ı normal veya hafif-orta zeka geriliği, %40' ı ağır zeka geriliği göstermektedirler. (176)

Araştırmada vakaların %30' a yakın kısmı ağır zeka geriliği gösteriyordu. Bu on puanlık farkın vaka sayısının azlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Eşlik eden durumlar açısından bakıldığında araştırmada en sık bulgunun Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DHEB) (%31) olduğu dikkati çekmektedir. Leyfer ve arkadaşları (2006), Debruin ve arkadaşları (2007), Ghaziuddin ve arkadaşları (1998), Mukaddes ve Fateh (2009) tarafından yapılan çalışmalarda OSB tanısı alan hastalarda en sık gözlenen psikiyatrik ek tanıların başında DEHB gelmektedir. Dominick ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada OSB tanısı alan çocukların yaklaşık %30' unun kendini yaralama, kendine zarar verme davranışlarından etkilendiği ortaya konmuştu. (177).Araştırmada bir vakanın bu tür saldırgan ve kendini yaralayıcı davranışlarda bulunduğu belirtilmiştir.

Otizm ve epilepsi birlikteliğinde literatürde artmış fakat değişken bir ilişki olduğundan bahsedilmektedir. Bu riskin ana faktörleri ise yaş, bilişsel düzey ve dil gelişiminin etkilenme düzeyidir. Buradan hareketle OSB' de klinik ve subklinik epilepsi riski adölesan dönemde, orta-ağır zeka geriliğinde ve dil gelişiminin ciddi şekilde etkilendiği durumlarda artmaktadır. Araştırmada OB grubunda 4 vakada elektrofizyolojik çalışmalarda anormallik tespit edilmiş fakat herhangi bir epileptik nöbet hikayesi alınmamıştır. Tuchman ve arkadaşları, nöbet hikayesi olmamasına karşı uzun süreli EEG kayıtlarında OSB' li hastaların yarısına yakınında EEG anomali tespit edilmiştir (155). Araştırmada EEG anomali tespit edilen vakaların zeka durumu incelendiğinde bir vakanın normal, bir vakanın hafif ve iki vakanında orta düzeyde zeka kusuru bulunduğunu tespit edildi.

6. SONUÇLAR

Araştırmada infantil dönem ve erken çocuklukta dirençli nöbet tanısı almış 26, otistik bozukluk tanısı almış 19 ve nöbete ilaveten otistik bozukluk tanısı almış 22 çocuk hastanın periferik kan örneklerinden DNA eldesi yapıldı. CDKL5 geninin 4. ekzonundaki A40V, 5. ekzonundaki I72N ve I72T, 7. ekzondaki C152P, 8. ekzondaki R175S, G178D ve P180L, 12. ekzondaki R444C ve 18. ekzondaki L879E mutasyonları RT-PZR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bu yöntemde aminoasit değişimlerine neden olan mutasyonların olduğu gen bölgelerinin uygun RNA primerleri ile çoğaltılmasında kullanılan primerler ve baz değişimini belirlemek amacı ile kullanılan proplar dizayn ettirildi. Bu proplardan bazıları mutant tipe bazıları ise wild tipe göre tasarlandırıldı. Proplar 5' ucunda LightCycler Red 640 ile işaretli olan proplardı. Başlangıçta denatürasyon ve PZR işlemleri gerçekleştirildi ve amplikon denen kısa DNA dizileri elde edildi. Daha sonra bu diziler tekrar denatüre edilerek ve ısı düşürüldü. Bu aşamada prob hedef sekansa bağlanmakta ve ısı tekrar artırılırken mutasyon varlığı veya yokluğuna göre erime eğrisi analizi ile de mutasyon tespit edilmektedir.

Araştırma Türk toplumunda CDKL5 geni ile ilgili yapılan ilk çalışma özelliği taşımaktadır.

Yapılan araştırmada literatürde patojen olarak belirlenen mutasyonların %20-25 kadarına bakılmasına rağmen dirençli nöbet grubunda 2 kız hastada değişikliğe rastlanmıştır. Bu dirençli nöbet grubunun yaklaşık %8'ine karşılık gelmektedir.

Literatürde CDKL5 mutasyonlarını taşıyan hastaların hemen hemen tamamında hayatın ilk 3 ayı içinde ortaya çıkan nöbetler, interiktal dönemlerde normal EEG paterni ve daha sonra epileptik ensefalopatiye dönüşme eğiliminde olan, en son dönemde ise ilaca dirençli hale gelen bir nöbet özelliğinden bahsedilmektedir. Mutasyonlu hastaların klinik fenotipleri oldukça geniştir. Ve bundan dolayı henüz tam bir genotip-fenotip korelasyonu sağlanamamıştır. Buradaki esas zorluk kimlere genetik analiz yapılacağı konusudur. Araştırmada ve daha önceki yapılan araştırmalarda CDKL5 geni için hedef grubun erken başlangıçlı dirençli nöbetleri ve epileptik ensefalopatisi olan, Rett sendromu benzeri bulguları olan fakat MeCP2 mutasyonu bulunmayan, erken dönemde etyolojisi bilinmeyen IS hikayesi ve ciddi mental retardasyonu bulunan özellikle kız hastalar olarak belirlenmiştir. Fakat çalışmalarda sık olmasa da erkek hastalarda mutasyonların gösterilmesi sadece kız hastalarla ilgili bir sınırlamanın doğru olmadığına işaret eder. Neonatal dönemde benzer bulguları olan erkek hastalarda taramalara dahil edilmelidir. Klinik bulguların yanı sıra fenotipte bazı durumlar için bazı özel EEG paternlerinden bahsedilse de henüz CDKL5 mutasyonlarına özgü bir EEG bulgusu belirlenmemiştir.

Literatürde erken başlangıçlı dirençli nöbeti olan kız çocuklarında mutasyon oranı % 9 iken bu oran ilaveten infantil spazmı olanlarda oran %28'e çıkmaktadır. Dirençli nöbet grubunda bulunan %8' lik oran literatürle uyumludur. Mutasyon sayısının artırıldığı ve hasta sayısının daha fazla olduğu gruplarda, hedef genin dizilenebileceği çalışmalar ile daha fazla sayıda hasta yakalanabileceğini düşünmekteyiz.

Bir çalışmaya göre CDKL5 gen mutasyonu olan hastaların yaklaşık %85' inde otistik bulguların varlığı otizm ile ilişkili bir durum olabileceği konusunda fikir vermiştir. Fakat araştırmada OB ve OB ve nöbet grubunda hiçbir hastada değişikliğe rastlanılmadı. Bunun sebebi hasta grubunun yeteri kadar büyük olamaması ve taranan mutasyonların sayısının azlığı ile açıklanabilir. Buna rağmen OSB olan hastalarda CDKL5 geni daha büyük araştırma gruplarında, daha ileri moleküler yöntemlerle ve daha fazla sayıda mutasyon taranarak bakılmalıdır. Çünkü hastalarda çok sık gözlenen otistik bulgular bu geni hedef gen haline getirebilir.

Hasta ve kontrol grubu bireylerinde CDKL5 geni değişiklikleri ile ilgili yaptığımız çalışmadan elde edilen genotipleme bulgularının, Türk toplumundaki ilk veriler olması bakımından önemli bir katkısının olacağını düşünmekteyiz. Araştırma CDKL5 geni ile ilgili oluşturulmaya çalışılan genotip-fenotip korelasyonuna yardımcı olarak, buradan

elde edilen verilerle ileride yapılacak çalışmalara kaynak oluşturması amacı ile hazırlanmıştır.

Araştırmadan elde edilen verilerin, daha da anlam kazanabilmesi için hasta sayısının artırılması, CDKL5 geninin tamamının mutasyonlar açısından değerlendirilmesi, hastaların uzun dönemde takip verilerinin de eklenmesiyle çalışmanın genişletilmesinin gerektiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Wiebe, S. P. Camfield, Jetté N et al. "Epidemiology of epilepsy: prevalence, impact, comorbidity and disparities." Can J Neurol Sci 2009 Aug;36 Suppl 2: S7-16.
2. Strzelczyk A, Reese JP, Dodel R, et al. Cost of epilepsy: a systematic review. Pharmacoeconomics 2008;26(6):463-76.
3. Allik H, Larsson JO, Smedje H (2006) Sleep patterns of school-age children with Asperger syndrome or high-functioning autism. J Autism Dev Disord 36:585-95.
4. Wassink TH, Piven J, Patil SR. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. Psychiatric Genetics. 2001;11:57-63.
5. Van Esch H, Jansen A, Bauters M, et al. Encephalopathy and bilateral cataract in a boy with an interstitial deletion of Xp22 comprising the CDKL5 and NHS genes. Am. J. Med. Genet. 2007 Feb 15;143(4):364-9.
6. Russo S, Marchi M, Cogliati F, et al. Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes. Neurogenetics 2009;10:241-50.
7. Nemos C, Lambert L, Giuliano F, et al. Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. Clin Genet 2009;76:357-71.
8. Thomas R. Browne, Gregory L. Holmes. Handbook of Epilepsy. Epilepsy: Definitions and Background. (3rd ed) USA, 2004:6-7.
9. Alan Guberman, J. Bruni. Essentials of Clinical Epilepsy. Epidemiology. (2nd ed) USA, 1999:3.
10. Page TE, Capps E, Rause WHD, et al. "Hippocrates, The sacred disease" Harward University Press (1967): 127-84.
11. Aktin E. Epilepsinin tarihçesi. Nöropsikiatri Arşivi, 1965;6(2):57-65.
12. Hauser W, Kurland LT. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. Epilepsia 1975;16:1-66.
13. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (ILAE). Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis. Epilepsia 1993;34:592-96.

14. Benjamin G Polkinghorne, David J Muscatello, C Raina MacIntyre, et al. Relationship between the population incidence of febrile convulsions in young children in Sydney, Australia and seasonal epidemics of influenza and respiratory syncytial virus, 2003-2010: a time series analysis, BMC Infect. Disease 2011;11:291.
15. WHO. Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis (Vol. Fact Sheet N 165) 2001a
16. Elçioğlu Ö. Geçmişte, Günümüzde Epilepsi (sar˘a). Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deontoloji ve Tıp Tarihi Anabilim Dalı, Bursa, 1987
17. Eşkazan E. Tarihte Epilepsi ve Epileptolojinin Kısa Tarihçesi. Bora İ. Yeni N. S. Gürses C. Editörler. Epilepsi. Nobel Tıp Kitabevleri; 3-11,2008.
18. Binder K. D, Scharfman E. H. Recent Advances in Epilepsy Research. Kluwer Academic\ Plenum Publishers; 12-35,2004.
19. Arzimanoglou A, Guerrini R, Aicardi J. Aicardi'nin Çocuklarda Epilepsi. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul; 7-13,2007.
20. Fisher R, van Emde Boas W, Blume W, et al. (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)". *Epilepsia* 46(4):470–2.
21. Walter G. Bradley, Robert B. Daroff, Gerald M. Fenichel, et al. Neurology in clinical practice. The Epilepsies. 2000;71:1745
22. WHO. World Health Organization: epilepsy: epidemiology, aetiology and prognosis. WHO Factsheet. 2001b
23. Poonam Nina Banerjee, David Filippi, and W Allen Hauser. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review, *Epilepsy Res.* 2009 July; 85(1):31-45.
24. Haerer AF, Anderson DW, Schoenberg BS. Prevalence and clinical features of epilepsy in a biracial United States population. *Epilepsia* 1986;27(1):66-75.
25. Kelvin EA, Hesdorffer DC, Bagiella E, et al. Prevalence of self-reported epilepsy in a multiracial and multiethnic community in New York City. *Epilepsy Research* 2007;77(2–3): 141-150.
26. Cruz ME, Schoenberg BS, Ruales J, et al. Pilot study to detect neurologic disease in Ecuador among a population with a high prevalence of endemic goiter. *Neuroepidemiology* 1985;4(2):108-116.

27. Melcon MO, Kochen S, Vergara RH. Prevalence and clinical features of epilepsy in Argentina. A community-based study. *Neuroepidemiology* 2007;28(1):8-15.
28. Reggio A, Failla G, Patti F, et al. Prevalence of epilepsy. A door-to-door survey in the Sicilian community of Riposto. *Ital J Neurol Sci* 1996;17(2):147–151.
29. Onal AE, Tumerdem Y, Ozturk MK, et al. Epilepsy prevalence in a rural area in Istanbul. *Seizure* 2002;11(6):397-401.
30. Hoeymans N, Melse JM, Schoenmaker CG: Gezondheid en determinanten. Deelrapport van de Volksgezondheid Toekomst Verkenning 2010 Van gezond naar beter. RIVM-rapport nr. 270061006 2010.
31. Basch EM, Cruz ME, Tapia D, et al. Prevalence of epilepsy in a migrant population near Quito, Ecuador. *Neuroepidemiology* 1997;16(2):94–98.
32. Lavados J, Germain L, Morales A, et al. A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984–1988. *Acta Neurol Scand* 1992;85(4):249-56.
33. Birbeck GL, Kalichi EM. Epilepsy prevalence in rural Zambia: a door-to-door survey. *Trop Med Int Health* 2004;9(1):92-95.
34. Olafsson E, Hauser WA. Prevalence of epilepsy in rural Iceland: a population-based study. *Epilepsia* 1999;40(11):1529-34.
35. Melodie R. Winawer, MD, MS. Epilepsy Genetics. *The Neurologist* 8:133-51, 2002.
36. Sander JWAS, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:433-43.
37. O. Charles Cockerell, Simon D. Shorvon. Epilepsy Current Concepts. Epidemiology. London–1996: 1
38. Bittencourt PRM, Adamolekun B, Bharucha N, et al. Epilepsy in the tropics. 1. Epidemiology, socioeconomic risk factors and etiology. *Epilepsia* 1996;37:1121-27.
39. Forsgren L. Prevalence of epilepsy in adults in northern Sweden. *Epilepsia* 1992;33 (3): 450-58.
40. Bharucha NE, Bharucha EP, Bharucha AE, et al. Prevalence of epilepsy in the Parsi community of Bombay. *Epilepsia* 1988;29(2):111-15.

41. Wright J, Pickard N, Whitfield A, et al. A population-based study of the prevalence, clinical characteristics and effect of ethnicity in epilepsy. *Seizure* 2000;9(5):309-13.
42. Benn EK, Hauser WA, Shih T, et al. Estimating the incidence of first unprovoked seizure and newly diagnosed epilepsy in the low-income urban community of Northern Manhattan, New York City. *Epilepsia*. 2008 Aug;49(8):1431-9.
43. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia* 1993;34(3):453-468.
44. MacDonald BK, Cockerell OC, Sander JW, et al. The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain* 2000;123 (Pt 4):665-76.
45. Forsgren L, Bucht G, Eriksson S, et al. Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. *Epilepsia* 1996;37(3): 224-29.
46. Granieri E, Rosati G, Tola R, et al. A descriptive study of epilepsy in the district of Copparo, Italy, 1964-1978. *Epilepsia* 1983;24(4):502-14.
47. Sidenvall R, Forsgren L, Blomquist HK, et al. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. *Acta Paediatr* 1993;82(1):60-65.
48. Olafsson E, Ludvigsson P, Gudmundsson G, et al. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *The Lancet Neurology* 2005;4(10):627-34.
49. Genetics of epilepsy, Manjari Tripathi and Satish Jain, *Current Science*, vol. 82, no. 6, 25 March 2002
50. Şahiner T. Epilepside Temel Mekanizmalar, Bora İ, Yeni N.S, Gürses C, Editörler. *Epilepsi. Nobel Tıp Kitabevleri*. İstanbul; 3–11, 2008
51. Kang JQ, Macdonald RL. Making sense of nonsense GABA (A) receptor mutations associated with genetic epilepsies. *Trends Mol Med* 2009;15(9):430-8.

52. Alexander GM, Godwin DW. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res* 2006;71(1):1–22.
53. Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, et al. 1999, Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. (3rd ed). *Advances in Neurology*, vol 79. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 699–708.
54. Stafstrom CE. Severe epilepsy syndromes of early childhood: the link between genetics and pathophysiology with a focus on SCN1A mutations. *J Child Neurol* 2009;24 Suppl 8:15-23.
55. Sánchez-Carpintero Abad R, Sanmartí Vilaplana FX, Serratosa Fernández JM. Genetic causes of epilepsy. *Neurologist* 2007;136 Suppl 1:47–51.
56. Aktekin B, Kayrak N. Epilepsilerde Sınıflandırma Çalışmaları. Bora İ, Yeni N.S, Gürses C, Editörler. *Epilepsi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul;3–11, 2008
57. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470–2.
58. Selma ÇELİK, Uzmanlık tezi. İdiopatik jeneralize epilepsili hastalarda talamik volumetri ve MR spektroskopik incelemeler, 2008, İstanbul
59. Regesta G, Tanganelli P. :Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsy *Epilepsy Res*. 1999 Apr;34(2–3):109-22.
60. Guberman A, Bruni J. *Essentials of clinical epilepsy*. (2nd ed). Woburn: Butterworth-Heinemann, 1999:111
61. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*2010;51:1069–77.
62. Gözde Yeşil, Adnan Yüksel, Uzmanlık Tezi Epilepsi hastalarında ilaç direncinin MDR1 genindeki C3435T ve G2677T/A polimorfizmleri ile ilişkisi, 2009, İstanbul
63. Guerrini R, Moro F, Kato M, et al. Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. *Neurology* 2007 Jul 31;69:427–33.
64. Kato M, Saitoh S, Kamei A, et al. A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). *Am J Hum Genet* 2007 Aug;81:361–66.

65. Marini C, Mei D, Temudo T, et al. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia* 2007 Sep;48:1678–85.
66. Depienne C, Bouteiller D, Keren B, et al. (2009) Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet* 2009 Feb;5(2):e1000381
67. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novomutations in the geneencodingSTXBP1 (MUNC18-1) cause earlyinfantileepilepticencephalopathy. *Nat Genet* 2008 June;40:782–88.
68. Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis.* 2010 May;38(2): 154–66.
69. Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, et al. Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain* 2008 Oct;131(Pt10) 2647–61.
70. Mari F, Azimonti S, Bertani I, et al. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005 Jul 15;(14)14:1935–46.
71. Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, et al. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2003 Jun; 72 (6):1401–11.
72. Tao J, Van Esch H, Hagedorn-GreiweM, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 2004 Dec75(6):1149–54.
73. Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet*2004 Dec;75(6):1079–93.
74. Scala E, Ariani F, Mari F, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 2005 Feb;42(2):103–7.
75. Maija Castreñ, Eija Gaily, Carola Tengström, et al. Epilepsy caused by CDKL5 mutations. *European journal of paediatric neurology* 2011 Jan 15(1):65–9
76. Montini E, Andolfi G, Caruso A, et al. Identification and Characterization of a Novel Serine–Threonine Kinase Gene from the Xp22 Region. *Genomics* 1998 Aug 1;51:427–33

77. Bahi-Buisson N, Kaminska A, Boddaert N, et al. The three stages of epilepsy in patients with CDKL5 mutations. *Epilepsia* 2008 Jun;49(6):1027–37.
78. Lin C, Franco B, Rosner M. R. CDKL5/Stk9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Hum. Molec. Genet.* 2005 Dec 15;(14)24:3775–86.
79. Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nature Rev. Genet.* 2006 Jun;7(6):415–26.
80. Russo S, Marchi M, Cogliati F, et al. Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes. *Neurogenetics* 2009 Jul;10(3):241–50.
81. Julie C. Evans, Hayley L. Archer, James P. Colley, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. *European Journal of Human Genetics* 2005 Oct;13(10): 1113–20.
82. M Elia, M Falco, R Ferri, et al. CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. *Neurology* 2008 Sep 23;71(13):997–9.
83. Archer HL, J Evans, S Edwards, et al. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet* 2006 Sep;43(9):729–34.
84. Volkmar FR, Lord C, Bailey A, et al. Autism and pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 2004 Jan;45(1):135–70.
85. DSM- IV Mental Bozuklukların Tanımsal ve Sayımsal El Kitabı, Dördüncü BaskıYeniden Gözden Geçirilmiş Tam Metin (DSM-IV-TR), Amerikan Psikiyatri Birliği,Washington DC.2000, Köroğlu E. (çev. ed.). Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 2007
86. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* 1968;35(4):100–36.
87. World Health Organization (WHO), The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders. Diagnostic Criteria for Research. 1993 WHO. Geneva
88. Lowe LH. Families of children with early childhood schizophrenia. Selecteddemographic information, *Arch Gen Psychiatry.* 1966 Jan;14(1):26–30.
89. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*,2009 Jun;65(6):591–8.

90. Bryson SE. Epidemiology of autism: Overview and issues outstanding. In: Cohen DJ, Volkmar FR (eds), *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders* (2nd ed) John Wiley& Sons. 1997 chapter 2.
91. Fombonne E. Is autism getting commoner? *British Journal of Psychiatry*, 2008 Jul;193 (1):59
92. Fred R, Volkmar FR, Ami Klin. *Pervasive Developmental Disorders*. Aydın H, Bozkurt E (çev. ed.), *Türkçe Kaplan & Sadock's, Comprehensive Textbook of Psychiatry*, sekizinci baskı, 2007, Güneş Kitabevi.
93. Ben Zeev Ghidoni B, Rett syndrome, *Child and Adolesc Psychiatry Clin ofN Am* 2007 Jul;16(3):723–43.
94. Gillberg C. The Epidemiology of Autism. In: Mary Colman (ed): *The Neurology of Autism*. Oxford University Press, pp. 119–36.
95. Eigsti IM, Shapiro T. A systems neuroscience approach to autism: biological, cognitive, and clinical perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2003;9(3):205–15.
96. Gousse V, Plumet MH, Chabane N. Fringe phenotypes in autism: a review of clinical, biochemical and cognitive studies. *Eur Psychiatry* 2002 May;17(3):120-28.
97. Cook EH, Leventhal BL. The serotonin system in autism. *Curr Opin Pediatr* 1996 Aug;8(4):348–54.
98. Shattock P, Kennedy A, Rowell F, et al. The role of neuropeptides in autism and their relationship with classical neurotransmitters. *Brain dysfunction* 1990 Nov;3(5–6):328-45
99. Panksepp J. A neurochemical theory of autism. *Trends in Neurosciences* 1979;2:172–77
100. Modahl C, Green L, Fein D, et al. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry* 1998 Feb 15;43:270–77.
101. Carlson ML. Hypothesis: is infantile autism a hypoglutamergic disorder? Relevance of glutamate-serotonin interaction of phamacotherapy. *J Neurol Trans* 1998 105;(4–5):525-35.
102. Warren RP, Margarten NC, Pace NC, et al. Immune abnormalities in patients with autism. *J Autism Dev Disord* 1986 Jun16;(2):189–197.

103. Gupta S. Immunological treatments for autism. *J Autism Dev Disord* 2000 Oct;30(5):475–79.
104. Nir I, Meir D, Zilber N, et al. Brief report: Circadian melatonin, thyroid stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *J Autism Dev Dis* 1995 Dec;25(6):641–54.
105. Rutter M, Schopler E Autism and pervasive developmental disorders: Concepts and diagnostic issues. *J Autism Dev Disord* Jun;17(2):159–86.
106. Lauritsen MB, Ewald H (2001), The genetics of autism. *Acta Psychiatr Scand* 2001 Jun;103(6):411–27.
107. Bailey AJ. The biology of autism. *Psychol Med* 1993 Feb;23(1):7–11.
108. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 1977 Sep;18(4):291–321.
109. Folstein S, Piven J. Etiology of autism: genetic influences. *Pediatrics* 1991 May;87(5):767–73.
110. Volkmar FR, Rhea P, Ami K. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Volume 1: Diagnosis, Development, Neurobiology, and Behavior* (3rd ed), John Wiley & Sons, Incorporated, 2005.
111. State MW. The genetics of child psychiatric disorders: focus on autism and Tourette syndrome. *Neuron* 2010 Oct;68(2):254–69.
112. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, et al. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A*. 2005 Jun 1;135(2):171–80.
113. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet*. 2006 Nov;43(11):843–9.
114. Coleman M, Catalania B, Introduction. The neurology of autism. In M Coleman (eds) 2005 Oxford, London pp. 3–40.
115. Bass MP, Menold MM, Wolpert CM, et al. Genetic studies in autistic disorder and chromosome 15. *Neurogenetics* 2000 Mar;2(4):219–26.

116. Taneli Y. Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Apolipoprotein E Gen Polimorfizminin Moleküler Genetik Yöntemle Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 2006.
117. Kent L, Evans J, Paul M, et al. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 1999 Mar;41(39):153–8.
118. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007 Apr 20;316(5823):445–9.
119. Christian SL, Brune CW, Sudi J, et al. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry.* 2008 Jun 15;63(12):1111–7.
120. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):477–88.
121. Glessner JT, Wang K, Cai G, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* 2009 May 28;459(7246):569–73.
122. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med.* 2008 Feb 14;358(7):667–75.
123. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):322–8.
124. Ben Shachar S, Lanpher B, German JR, et al. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *J Med Genet.* 2009 Jun;46(6):382–8.
125. Brooks SS, Wisniewski K, Brown WT. (1994). New X-linked mental retardation (XLMR) syndrome with distinct facial appearance and growth retardation. *Am J Med Genet* 1994 Jul 15;51(4):586–90.
126. Bailey D, Hatton D, Mesibov G, et al. Early development, temperament, and functional impairment in autism and fragile X syndrome. *J Autism and Dev Disord.* 2000 Feb;30(1):49–59.
127. Feinstein C, Reiss A. Autism: The point of view from fragile X studies. *J Autism and Dev Disord.* 1998 Oct;28(5):393–405.

128. Hagerman, R. Clinical and molecular aspects of fragile X syndrome. In: Tager Flusberg (eds). Neurodevelopmental disorders. MIT Press, Cambridge 1999, pp. 27-42.
129. Merenstein S, Sobesky W, Taylor A, et al. Molecular clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet* 1996 Aug 9; 64(2):388–94.
130. Schenck A, Bardoni B, Langmann C, et al. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron*. 2003 Jun 19;38(6):887–98.
131. Handa V, Goldwater D, Stiles D, et al. Long CGG-repeat tracts are toxic to human cells: implications for carriers of Fragile X premutation alleles. *FEBS Lett*. 2005 May 9;579(2):2702–8.
132. Hagerman RJ, Rivera SM, Hagerman PJ. The Fragile X Family of Disorders: A Model for Autism and Targeted Treatments. *Curr Pediatr Rev*. 2008 Aug;4(2):40–52.
133. Hatton DD, Sideris J, Skinner M, et al. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am J Med Genet A* 2006 Sep 1; 140A(17):1804–13.
134. Dimitropoulos A, Schultz RT. Autistic like symptomatology in Prader–Willi syndrome: a review of recent findings. *Curr Psychiatry Rep* 2007 Apr;9(2):159–64.
135. Veltman MW, Craig EE, Bolton PF. Autism spectrum disorders in Prader–Willi and Angelman syndromes: a systematic review. *Psychiatr Genet* 2005 Dec;15(4):243–54.
136. Prasher VP, Clarke DJ. Case report: challenging behaviour in a young adult with Down’s syndrome and autism. *Br J Learn Disabil* 1996;24:167–9.
137. Molloy CA, Murray DS, Kinsman A, et al. Differences in the clinical presentation of trisomy 21 with and without autism. *J Intellect Disabil Res* 2009 Feb;53(2):143–51.
138. Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, et al. Brief report: ‘the autism epidemic’. The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* 2006 Apr;36(3): 429–35.

139. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, et al. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet*. 2005 Apr;42(4):318–21.
140. Buxbaum JD, Cai G, Chaste P, et al. Mutation screening of the PTEN gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jun 5;144B(4):484–91.
141. Kent L, Bowdin S, Kirby GA, et al. Beckwith Weidemann syndrome: a behavioral phenotype/genotype study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008 Oct 5;147B(7): 1295–7.
142. Wong V. Study of the relationship between tuberous sclerosis complex and autistic disorder. *J Child Neurol* 2006 Mar;21(3):199–204.
143. de Vries PJ, Hunt A, Bolton PF. The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC): a postal survey of UK families. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2007 Feb;16(1):16–24.
144. Fombonne E, Du M, Cans C, et al. Autism and associated medical disorders in a French epidemiological survey. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997 Nov;36(11):1561-9.
145. Ozonoff S, Williams BJ, Gale S. Autism and autistic behavior in Joubert syndrome. *J Child Neurol* 1999 Oct;14(10): 636–41.
146. Artigas-Pallares J, Gabau-Vila E, Guitart-Feliubadalo M. Syndromic autism. II. Genetic syndromes associated with autism. *Rev. Neurol*. 2005 Jan 15;40 Suppl. 1 151–62.
147. Holroyd S, Reiss AL, Bryan RN. Autistic features in Joubert syndrome: a genetic disorder with agenesis of the cerebellar vermis. *Biol. Psychiatry* 1991 Feb 1;29(3):287–94.
148. Kumandas S, Akcakus M, Gumus H, et al. Joubert syndrome: review and report of seven new cases. *Eur J Neurol* 2004 Aug;11(8):505–10.
149. Gillberg C, Coleman M. (2000): *The Biology of the Autistic Syndromes*. 3rd edition. London, UK: Mac Keith Press, Cambridge University Press.
150. Gillberg C, Coleman M. *The biology of the autistic syndromes* (2nd ed). Mc Keith Press, London 1992.

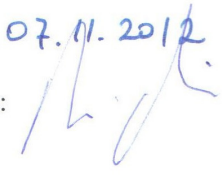
151. Van den Berghe G, Vincent MF, Jaeken J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1997 Jun;20(2):193–202.
152. Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P. Autism and metabolic diseases. *J Child Neurol* 2008 Mar;23(3):307–14.
153. Johansson M, Wentz E, Fernell E, et al. Autistic spectrum disorders in Mobius sequence: a comprehensive study of 25 individuals. *Dev Med Child Neurol*. 2001 May;43(5):338–45.
154. Ahmet O Caglayan. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev Med Child Neurol*. 2010 Feb;52(2):130–8.
155. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism, *Lancet Neurol*. 2002 Oct;1(6):352–8.
156. Deykin EY, MacMahon B. The incidence of seizures among children with autistic symptoms. *Am J Psychiatry* 1979; 136:1310–12.
157. Aicardi J. *Epilepsy in children* (2nd ed). Raven Press, New York 1994.
158. Kim HL, Donnelly JH, Tournay AE, et al. Absence of seizures despite high prevalence of epileptiform EEG abnormalities in children with autism monitored in a tertiary care center. *Epilepsia*. 2006 Feb;47(2):394–8.
159. Rapin I, Katzman R. Neurobiology of autism. *Ann Neurol* 1998 Jan;43(1):7–14.
160. Kemper TL, Bauman ML. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol Clin* 1993 Feb;11(1):175–87.
161. Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 2002 Feb 12; 58(3):428–32.
162. Tuchman RF, Rapin I, Shinnar S. Autistic and dysphasic children, II: epilepsy. *Pediatrics* 1991 Dec;88(6):1219–25.
163. Riikonen R, Amnell G. Psychiatric disorders in children with earlier infantile spasms. *Dev Med Child Neurol* 1981 Dec;23(6):747–60.
164. Volkmar FR, Nelson DS. Seizure disorders in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1990 Jan;29(1):127–29.
165. Olsson I, Steffenburg S, Gillberg C. Epilepsy in autism and autistic-like conditions: a population-based study. *Arch Neurol* 1988 Jun;45(6):666–68.
166. Natacha Akshoomoff, Nikdokht Farid, Eric Courchesne, et al. Abnormalities on the Neurological Examination and EEG in Young Children with Pervasive Developmental Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2007 May;37(5):887–93.

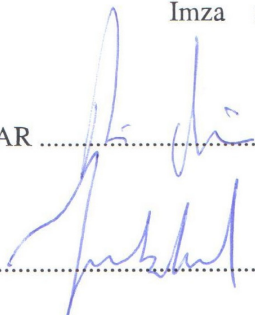
167. Tuchman R, Jayakar P, Yaylali I, Villalobos R. Seizures and EEG findings in children with autism spectrum disorders. *CNS Spectrums* 1997;3:61–70.
168. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995 9:576–96.
169. Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, et al. CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem* 2008 283;30:101–11.
170. Liang JS, Shimojima K, Takayama R, et al. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders, *Epilepsia*, 2011 52(10):1835–42.
171. Intusoma U, Hayeeduereh F, Plong-On O. Mutation screening of the CDKL5 gene in cryptogenic infantile intractable epilepsy and review of clinical sensitivity. *European journal of pediatric neurology* 15 (2011) 432–38.
172. Schultz RT. Developmental deficits in social perception in autism: The role of the amygdala and fusiform face area. *Int J Develop Neuroscience* 2005 23:125–41.
173. Howlin P and Asgharian A. The diagnosis of autism and Asperger syndrome: findings from a survey of 770 families. *Dev Med Child Neurol* 1999 41:834–39.
174. De Giacomo A and Fombonne E. Parental recognition of developmental abnormalities in autism. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 1998 7:131–36.
175. Wiggins LD et al. Examination of the time between first evaluation and first autism spectrum diagnosis in a population-based sample. *J Dev Behav Pediatr* 27b2006 Supp 1:79–87.
176. Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, et al. Prevalence of Parent- Reported Diagnosis of ASD Among Children in the US. *Pediatrics*. 2009 Nov;124(5):1395–403.
177. Dominic KC, Davis NO, Lainhart J, et al. "Atypical behaviors in children with autism and children with a history of language impairment". *Res Dev Disabil* 2007 28(2):145–62.

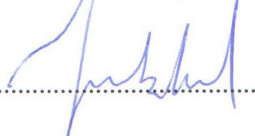
T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

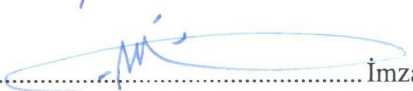
Dr. Murat ERDOĞAN'a ait 'İNFANT VE ERKEN ÇOCUKLUK DÖNEMİNDE DİRENÇLİ NÖBET, OTİSTİK BOZUKLUK VE NÖBETİN EŞLİK ETTİĞİ OTİSTİK HASTALARDA CDKL5 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI' jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

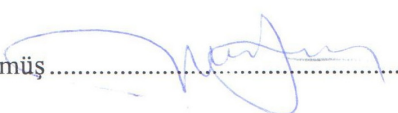
Tarih : 07.11.2012

İmza : 

Başkan Prof. Dr. Munis DÜNDAR İmza 

Üye Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL İmza 

Üye Doç. Dr. Çetin SAATÇI İmza 

Üye Doç. Dr. Hakan GÜMÜŞ İmza 

Üye Yrd. Doç. Dr. Didem B.Öztop İmza 