

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2021;14(3):453-464

doi: 10.26559/mersinsbd.890545

Otizm spektrum bozukluğu tanılı çocuklarda plazma amino asit düzeylerinin değerlendirilmesi

 Özgür Aslan¹,  Burcu Kardaş²,  Mehmet Nuri Özbek³

¹ Sağlık Bilimleri Ü. Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hast. Tıbbi Biyokimya Bölümü

² Sağlık Bilimleri Ü. Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hast. Çocuk ve Ergen Psikiyatri Bölümü

³ Sağlık Bilimleri Ü. Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hast. Çocuk Endokrinoloji Bölümü

Öz

Amaç: Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) ortalama tanı yaşı üç yıl civarında olan nörogelişimsel bir bozukluktur. Erken ve daha hızlı tanıda aday amino asitlere ilişkin metabolomik çalışmalar klinisyenler için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada OSB'li çocuklarda 37 plazma amino asit, yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Bu çalışmaya Eğitim ve Araştırma Hastanesinde OSB tanısı almış yirmi üç çocuk (19 erkek ve 4 kız) ve OSB'si olmayan yaş ve cinsiyeti eşleştirilen 24 çocuk alınmıştır. 37 plazma amino asit LC-MS/MS cihazı ile ölçülmüştür. **Bulgular:** OSB grubunda kontrol grubuna göre anserin, asparagin, sitrülin, glutamik asit, hidroksiprolin, N-metil-histidin, ornitin, valin anlamlı olarak düşük saptanırken ve sarkozin anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. **Sonuç:** Üre döngüsü bozuklukları ile ilişkili plazma ve idrar amino asitlerinin kombinasyonunun incelenmesi yeni araştırmalar için önerilebilir. Hidroksiprolindeki önemli düşüş, OSB'deki kas zayıflığını açıklama potansiyeli yaratabilir. Literatürdeki amino asit seviyelerindeki çelişkili düzeylerin metodolojik veya biyolojik farklılıklardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını söylemek zor olsa da, daha ileri çalışmalar konuyu daha net hale getirecektir.

Anahtar Kelimeler: Otizm spektrum bozukluğu, amino asitler, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi, hidroksiprolin, üre döngüsü bozuklukları

Başvuru Tarihi: 04.03.2021

Kabul Tarihi: 13.07.2021

Sorumlu Yazar: Özgür Aslan, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diyarbakır Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Kayapınar/Diyarbakır. Tlf: 0 (412) 258 00 60-2993, E-posta: ozguraslan44@yahoo.com

Not: Çalışma 6. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi (UTSAK) 10 - 11 Nisan 2021'de sözlü olarak sunulacaktır.

Evaluation of plasma amino acid levels in children diagnosed with autism spectrum disorder

Abstract

Aim: Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disease with an average diagnosis age over three years. Metabolomic studies pointing out candidate amino acids are of major importance to guide trained clinicians for an early and faster diagnosis. We aimed to evaluate 37 plasma amino acids in children with ASD compared to age and sex matched controls in this study. **Method:** Twenty three children diagnosed with ASD in Research and Training Hospital (19 boys and 4 girls) and, age and gender matched 24 children without ASD were enrolled in this study. A total of 37 amino acid levels were measured with LC-MS/MS device. **Results:** While anserine, asparagine, citrulline, glutamic acid, hydroxyproline, N-methyl-histidine, ornithine, valine were significantly lower, sarcosine was significantly higher in ASD group compared with control group. **Conclusions:** Studying the combination of plasma and urine amino acids related to urea cycle disorders can be recommended for new investigations. The significant decrease in hydroxyproline can create the potential to explain muscle weakness in ASD. Although it is difficult to say whether the difference in the levels of conflicting amino acids in the literature is due to methodological or biological differences, further studies will make the subject clearer.

Keywords: Autism spectrum disorder, amino acids, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, hydroxyproline, urea cycle disorders

Giriş

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), heterojen etyolojisi olan ve çeşitli klinik semptomlarla kendini gösteren güçlü genetik temeli olan nörogelişimsel bir bozukluktur. Ana belirtileri sosyal iletişimdeki ve etkileşimdeki eksiklikler, tekrarlayan davranış kalıpları, sınırlı ilgi alanları veya etkinlikler şeklinde kendini gösterir.^{1,2} OSB olan bireylerde temel davranışsal semptomların ötesinde, gastrointestinal, immün, hepatik ve endokrin sistemleri etkilediği görülmektedir. Yaygın komorbiditeler arasında nörolojik, psikiyatrik ve fiziki durumlar yer alır: nörolojik komorbiditeler arasında epilepsi, uyku bozukluğu, duyuusal anormallikler ve motor fonksiyonundaki gecikmeler ve/veya eksiklikler; depresyon, anksiyete, sinirlilik ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu gibi psikiyatrik durumlar ve kronik gastrointestinal rahatsızlık gibi fiziksel sağlık sorunları yer alır.³ Bir ya da daha fazla OSB dışı gelişimsel hastalık birlikte görülme oranı %83 düzeylerine kadar çıkmaktadır.⁴ Bu durum OSB'li bireylerde bozulmuş yaşam kalitesi ile ilişkilidir ve OSB'li bir bireyi desteklemenin yaşam boyu maliyeti, komorbid bozukluklar nedeniyle çok

yüksektir.^{2,5} Toplam OSB prevalansı tahminleri, 8 yaşın üzerindeki 1000 çocuk başına 13.1 - 29.3 arasında değişmektedir. Erkekler kadınlardan dört kat daha fazla OSB oranına sahiptir, OSB prevalansı tahminleri ayrıca cinsiyet ve ırk/etnik kökene göre değişmektedir.^{1,6}

OSB'nin genetik nedenleri vakaların yaklaşık %30-35'inde görülmektedir. Hastaların geriye kalan %65-70'i için, çevresel faktörlerin ve farklı genetik nedenlerin etkileşiminden OSB'ye neden olabileceği konusunda genel bir fikir birliği vardır. Çevresel faktörler de epigenetik modifikasyonlarda yer alabilir ve yansiyabilir.⁷

Çeşitli kanıtlar, merkezi beyin fonksiyonları ile ilişkili nöroaktif amino asitlerdeki değişikliklerin, OSB ile ortak olarak, kognitif bozukluk ve sosyal etkileşimlerle ilgili problemler gibi semptomları olan çeşitli psikiyatrik bozuklukların patogeneğinde ve/veya farmakoterapisinde rol oynadığı bildirilmiştir.⁸ Bazı prelinik ve klinik çalışmalarda OSB'nin etiyolojisinde nöroaktif amino asitlerin olduğu bildirilmiş ve bu çalışmaların çoğunda glutamat, GABA

ve/veya glutamin üzerinde durulmuştur.⁹⁻¹³ Bu etiyojide diğer amino asitler de dahil olabilir ve bu amino asitlerin bir kısmının aynı anda araştırıldığı kapsamlı çalışmalar yapmak önemli olabilir. Nöroaktif amino asitlerin OSB patogenezinde ve tedavisinde potansiyel rolü nedeniyle, OSB hastalarında erken tanı ve müdahale ile ilgili olmaları durumunda vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarındaki değişikliklerin izlenmesi de önemlidir.⁸ OSB tanısı şu anda davranışsal özelliklere dayanmaktadır ve 24 ay civarında tanı konulabilsede, ortalama tanı yaşı üç yıl civarındadır. Yeni yürümeye başlayan çocuğa OSB tanısı konulması zor olmakta ve yoğun davranışsal tedavinin engelliliği azaltmada etkili olduğu ve daha da önemlisi ne kadar erken müdahale edilirse o kadar iyi bir tedavi süreci olacağından aileler bir an önce kesin tanının konulması konusunda beklenti içindedirler.^{14,15} Transkriptomik, proteomik ve metabolomik profiller OSB tanısı için önerilmiştir. OSB'nin etiopatogenezi ile ilgili birçok biyobelirteç çalışması mevcut olup bu alandaki çalışmaların OSB'nin tanılanma performansını geliştirilmesi umulmaktadır.⁸

OSB'nin etyolojisinde ve/veya metabolik süreçlerinde amino asit düzeylerinin önemli olduğu belirtilse de, bu konuda yapılan çalışmalarında yetersiz olduğu vurgulanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada OSB'li çocuklarda 37 plazma amino asidin, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrol grubuna göre değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem

OSB tanısı almış (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM 5 kriterlerine göre) ve plazma amino asit düzeyleri çalışılmış bireylerin 2016-2018 yılları arasındaki sonuçları değerlendirildi. Kontrol grubu hastanenin diğer polikliniklerine başvurmuş ve herhangi nörolojik ve metabolik bulgusu olmayan gönüllü bireylerden seçildi. Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diyarbakır Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (No: 05.10.2018 - 144).

Çocuk ve ergen psikiyatri kliniğine başvuran 23 OSB olan çocuk (5-18 yaş arası 19 erkek çocuk, 5-16 yaş arası 4 kız çocuk) çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak yaşları eşleştirilmiş 19 erkek çocuk, 5 kız çocuk olmak üzere toplam 24 çocuk alındı. OSB grubundaki çocuklara DSM-5 kriterlerine göre tanı konuldu, kontrol grubu için K-SADS (Okul Çağı Çocukları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi, Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia, K-SADS) uygulandı ve bir çocukta ansiyete bozukluğu dışında başka psikiyatrik bozukluk saptanmadı. Tüm katılımcıların herhangi bir özel diyetleri yoktu ve OSB'li grupta bir çocukta Pica bozukluğu vardı. Bununla birlikte, katılımcıların herhangi bir teşhis edilen metabolik bozukluğu yoktu.

Hastanemizde plazma amino asit düzeyleri için aç karına alınmış numuneler dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (Becton Dickinson Vacutainer Systems, USA) içeren tüplere alınmaktadır. Uygun santrifüj işleminden sonra plazması ayrılmış örneklerden amino asit düzeyleri çalışılmıştır. Çalışma prensibine göre; plazma amino asitleri asidik ekstraksiyon ve deproteinasyon işlemleri ile numunelerden ekstrakte edilir. Ekstrakte edilen analitler reaktifler ile türevlendirilir. Türevlendirilmiş aminoasitler iyice kuruyana kadar uçurma işlemi uygulanır. Uçurma işleminden sonra tekrar reaktif eklenecek çözülür ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilir. Standardın alanına karşı standart konsantrasyonu grafiği çizilir. Regresyon eğrisini hesaplamak için, her bir standarda karşılık gelen sinyal değeri grafiğe alınır. Bilinmeyen konsantrasyonu regresyon eğrisinin fonksiyonundan direkt olarak okunabilir.

Çalışmadaki bütün örnekler rutin laboratuvarımızda kullanılan Tandem Gold liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) System (Zivak Technologies, Turkey) cihazı ve orijinal kitleri ile çalışılmıştır. Cihazda 3-methyl-histidine (3-MeHiS), Alpha-aminoadipic acid (Aaa), Alpha-aminobutyric acid (Aba), Alanine (Ala), Anserine (Ans), Alpha-aminopimelic acid (Apa), Arginine (Arg), Asparagine (Asn), Aspartic Acid (Asp), Beta-

aminoisobutyric acid (Baib), Beta alanine (Bala), Citrulline (Cit), Cystathionine (Cth), Gamma-aminobutyric acid (GABA), Glutamine (Gln), Glutamic Acid (Glu), Glycine (Gly), Histidine (His), Histamine (Hista), Hydroxylysine (Hyl), Hydroxyproline (Hyp), Isoleucine (Ileu), Leucine (Leu), Lysine (Lys), N-methyl-histidine (NMeHis), Methionine (Met), Ornithine (Orn), Phenylalanine (Phe), Proline (Pro), Sarcosine (Sar), Serine (Ser), Serotonin (Srtn), Threonine (Thr), Thiaproline (Thpr), Tryptophan (Trp), Tyrosine (Tyr), Valine (Val) olmak üzere toplam 37 amino asit değerlendirildi.

İstatiksel analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için Windows tabanında çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA) for Windows paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım analizi için Shapiro-Wilk test kullanıldı ve gruplar arasındaki fark için Mann-Whitney U test yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya 23 OSB olan ve 24 kontrol olmak üzere 47 çocuk alındı. OSB ve kontrol grubundaki çocukların sırasıyla kronolojik yaşları ortalama 11.52 yıl ve 11.64 yıl, ağırlıkları 47.61 kg ve 41.38 kg, boyları 147.22 cm ve 146.17 cm olarak saptandı. OSB'li çocukların ortalama tanı yaşı ise 3.00 olarak saptandı. OSB'li grupta komorbiditeler dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan yedi çocuk, entellektüel yeti yitimi olan hafif düzeyde 11 çocuk, orta düzeyde 9 çocuk, ağır düzeyde iki çocuk ve sınırdaki zihinsel işlevsellik olan bir çocuk saptandı. OSB'li grupta kekeme olan bir çocuk saptandı. Ayrıca OSB'li grupta EEG defekti olan bir çocuk vardı, nöbet geçiren ise iki çocuk vardı (Tablo 1).

Doğumları OSB'li grupta normal spontan vaginal doğum (NSVD) olan 18, sezaryen doğum (cesarean section, C/S) olan beş; kontrol grubunda NSVD olan 14, C/S

olan 10 şeklinde gerçekleşmişti. Aile ve aile yakınında OSB olan, OSB'li grupta 10, kontrol grubunda ise 1 çocuk vardı. OSB'li çocuklar belli başlı semptomlara yönelik (davranış sorunları, agresyon, saldırganlık vs.) ilaçlar (risperidon, atomoksetin, haloperidol, naltreksone, aripiprazol) kullanıyorlardı veya kullanmayı bırakmışlardı. Kontrol grubunda ise bir çocuk kaygı bozukluğu, bir çocukta astım nedeniyle ilaç (fluoksetin, hidroksizin, salbutamol, montelukast ve desloratadin) kullanıyordu (Tablo 1).

Çocukların ailesel özellikleri; doğumda anne yaşı OSB'li grupta 31,09 (min:22 - maks: 41), kontrol grubunda 31,17 (min:22 - maks: 38); doğumda baba yaşı OSB'li grupta 36,57 (min:26 - maks: 52), kontrol grubunda 35,33 (min:27 - maks: 43); akraba evliliği OSB'li grupta dokuz, kontrol grubunda 3; ailede otizm bulunma durumu OSB'li grupta 10, kontrol grubunda 1; ailede psikiyatrik hastalık bulunma durumu OSB'li grupta 14, kontrol grubunda dört; annede gebelikte sigara kullanımı OSB'li grupta 10, kontrol grubunda iki; babada sigara kullanımı OSB'li grupta 11, kontrol grubunda 16 şeklindeydi (Tablo 1). OSB'li grup ile kontrol grubu arasında çocuk kronolojik yaş, ağırlık, boy, doğumda anne yaşı, doğumda baba yaşı için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (sırasıyla $p = 0.865, 0.366, 0.932, 0.932, 0.482$).

Plazma amino asit düzeyleri ortalama \pm SD, ortanca, en düşük-en yüksek olarak Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tüm vakalar için Aaa, Apa, Baib, Cth, GABA, Hista, Hyl, Thpr amino asit düzeyleri ölçüm sınırının altında kalmıştır (sırasıyla 1.50, 1.20, 2.33, 2.32, 3.30, 0.83, 0.66, 2.09 $\mu\text{mol/L}$).

OSB'li grupta kontrol grubuna göre Ans, Asn, Cit, Glu, Hyp, NMeHis, Orn, Val amino asitlerinde ortalama plazma düzeylerinde anlamlı düşüklük, Sar'de ortalama plazma düzeylerinde anlamlı yükseklik saptandı (Tablo 2) (Şekil 1).

Tablo 1: Çalışmaya dahil edilen çocukların klinik ve ailesel özellikleri

Özellik	OSB (n=23)	Kontrol (n=24)
Cinsiyet	Kız: 4 (%17.3) Erkek: 19 (%82.6)	Kız: 5 (%20.8) Erkek: 19 (%79.1))
Kronolojik yaş (yıl)	11.52 (min:5.10 - maks:18.27)	11.64 (min:5.43 - maks: 18.37)
Ağırlık (Kg)	47.61 (min:19 - maks:85)	41.38 (min:18 - maks:78)
Boy (cm)	147.22 (min:114 - maks:173)	146.17 (min:110 - maks:176)
Doğumda anne yaşı	31.09 (min:22 - maks: 41)	31.17 (min:22 - maks: 38)
Doğumda baba yaşı	36.57 (min:26 - maks: 52)	35.33 (min:27 - maks: 43)
Tanı alma yaşı (yıl)	3.00 (min: 1.20-maks: 5)	Hayır
Doğum travması	Evet: 4 Hayır: 17	Evet: 1 Hayır: 23
Doğum tipi	Bilinmeyen: 2 NSVD: 18 (%78.3) C/S: 5 (%21.7)	Prematüre: 1 NSVD: 14 (%58.3) C/S: 10 (%41.7)
Komorbidite	DEHB: 7 (%30.4) Pica: 1 (% 4.3) Kekeme: 1 (% 4.3) Hafif: 1 (% 4.3)	Hayır
Eşlik eden entellektüel yeti yitimi	Orta: 9 (% 39.1) Ağır: 2 (% 8.7) Çok ağır:0 SZİ: 1 (% 4.3)	Hayır
Eşlik eden fiziksel hastalık	Görme bozukluğu: 2 Duyma bozukluğu: 2 VKİ >25: 2 Hayır: 17	Hayır
Nöbet öyküsü	Evet: 2 (% 8.7) Hayır: 21 (% 91.3)	Hayır
İlaç kullanımı	Evet: 16 (% 69.6) Hayır:7 (% 30.4)	Evet: 2 (%8.3) Hayır: 22 (% 91.7)
Akraba evliliği	Evet: 9 (% 39.1) Hayır:14 (% 60.9)	Evet: 3 (%12.5) Hayır:21(%87.5)
Ailede otizmin varlığı	Evet:10 Hayır: 13	Evet: 1 (%4.2) Hayır: 23 (%85.8)
Ailede psikiyatrik hastalık varlığı	Evet: 14 (% 39.1) Hayır: 9 (% 60.9)	Evet: 4 (%16.7) Hayır: 20 (%83.3)
Hamilelik sırasında annenin sigara kullanımı	Evet: 10 (% 43.5) Hayır: 13 (%56,5)	Evet: 2 (%8.3) Hayır: 22 (% 91.7)
Babada sigara kullanımı	Evet: 11(% 47.8) Hayır: 12 (% 43.2)	Evet: 16 (%66.7) Hayır: 8 (%33.3)

SZİ: Sınırdan zihinsel işlevsellik VKİ: Vücut kitle indeksi, NSVD: Normal spontan vaginal doğum, C/S: Sezaryen doğum.

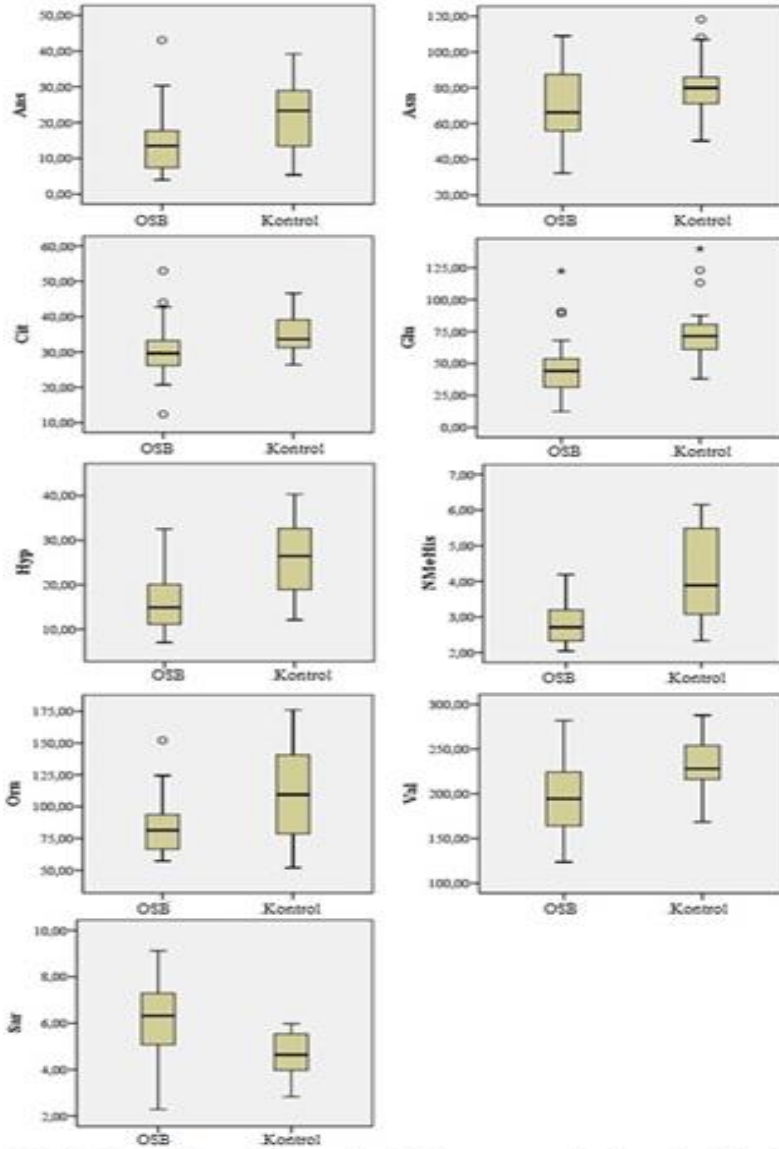
Tablo 2: Plasma amino asit düzeyleri.

Amino Asit	Grup	N	Ortalama (µmol/L)	Min- Maks	SS	p değeri
3-Mehıs	OSB	23	4.27	1.99-13.72	3.61	0.152
	Kontrol	24	4.98	1.99-14.63	3.63	
Aba	OSB	23	10.03	5.10-18.78	3.43	0.085
	Kontrol	24	11.47	5.86-19.16	3.44	
Ala	OSB	23	386.85	195.84-605.06	103.52	0.718
	Kontrol	24	371.38	127.59-529.34	101.43	
Ans	OSB	23	14.62	3.95-43.06	9.48	0.007*
	Kontrol	24	21.74	5.36-39.21	9.46	
Arg	OSB	23	62.68	26.02-128.37	22.18	0.225
	Kontrol	24	54.86	26.70-92.57	17.89	
Asn	OSB	23	68.75	32.23-109.06	21.78	0.045*
	Kontrol	24	80.99	50.32-118.28	16.56	
Asp	OSB	23	4.95	0.75-10.28	2.71	0.067
	Kontrol	24	3.63	1.99-7.49	1.50	
Bala	OSB	23	2.74	1.36-4.34	1.02	0.848
	Kontrol	24	2.67	1.74-4.04	0.68	
Cit	OSB	23	31.00	12.38-52.98	8.61	0.028*
	Kontrol	24	35.31	26.39-46.63	5.99	
Gln	OSB	23	502.46	302.01-889.41	151.56	0.067
	Kontrol	24	556.16	300.80-779.70	101.30	
Glu	OSB	23	46.11	12.37-122.38	26.76	<0.001*
	Kontrol	24	73.47	38.05-139.79	24.36	
Gly	OSB	23	240.81	179.77-312.73	42.31	0.949
	Kontrol	24	239.00	162.90-310.06	40.40	
His	OSB	23	76.73	63.06-106.51	11.44	0.407
	Kontrol	24	73.70	54.81-120.49	12.88	
Hyp	OSB	23	16.51	7.04-32.52	7.27	<0.001*
	Kontrol	24	26.37	12.11-40.35	8.18	
Ileu	OSB	23	63.13	34.36-142.22	26.52	0.225
	Kontrol	24	62.34	40.92-80.35	9.78	
Leu	OSB	23	108.31	76.09-148.04	22.84	0.058
	Kontrol	24	120.66	85.35-172.72	18.59	
Lys	OSB	23	138.32	89.85-247.10	33.71	0.625
	Kontrol	24	140.88	113.29-227.44	24.98	
Met	OSB	23	30.16	20.16-59.48	8.52	0.209
	Kontrol	24	31.73	18.38-44.86	7.36	
NMeHis	OSB	23	2.84	2.05-4.19	0.57	<0.001*
	Kontrol	24	4.28	2.33-6.15	1.24	
Orn	OSB	23	84.25	57.31-152.17	23.74	0.006*
	Kontrol	24	111.89	52.01-176.05	36.80	
Phe	OSB	23	55.78	42.22-84.25	10.73	0.766
	Kontrol	24	57.16	41.67-90.41	12.28	
Pro	OSB	23	201.92	87.60-530.13	91.10	0.782
	Kontrol	24	199.21	113.53-329.24	46.88	
Sar	OSB	23	6.13	2.29-9.12	1.92	0.001*
	Kontrol	24	4.63	2.83-5.98	0.90	
Ser	OSB	23	133.44	94.66-186.17	25.30	0.915
	Kontrol	24	133.09	84.53-181.44	23.62	
Srtn	OSB	23	2.93	1.33-8.14	2.10	0.316
	Kontrol	24	3.26	1.33-6.18	1.66	

Tablo 2'nin devamı: Plasma amino asit düzeyleri.

Amino Asit	Grup	N	Ortalama (µmol/L)	Min- Maks	SS	p değeri
Thr	OSB	23	157.80	90.67-262.76	46.42	0.882
	Kontrol	24	157.52	104.30-251.74	33.92	
Trp	OSB	23	38.11	22.57-52.61	6.57	0.136
	Kontrol	24	40.14	21.90-54.39	6.95	
Tyr	OSB	23	56.81	37.80-90.06	14.56	0.551
	Kontrol	24	58.94	31.76-92.50	16.54	
Val	OSB	23	194.73	123.71-282.06	42.36	0.003*
	Kontrol	24	230.98	168.53-287.84	28.62	

*p <0.05 anlamlı.

**Şekil 1.** OSB ve Kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanan aminoasitler.

Tartışma

Plazma amino asit düzeyleri LC-MS/MS yöntemi ile çalışılmış OSB 'li 23 çocuk ve kontrol grubu olarak alınan 24 çocukta yapılan bu çalışmada; OSB grubunda Ans, Asn, Cit, Glu, Hyp, NMeHis, Orn, Val amino asitlerinde anlamlı düşüklük ve Sar'da ise anlamlı yükseklik saptanmıştır. Diğer amino asitlerin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında OSB'li grupta anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 2).

N-metilhistidin esas olarak diyet etindeki anserinden kaynaklanır. Karnosinaz enzimi anserini β -alanin ve NMeHis'e ayırır. Yüksek NMHis seviyeleri, karnosinaz enzimini inhibe etme ve anserin seviyelerini artırma eğilimindedir. Azalan serum karnosinaz aktivitesi, Parkinson hastalığı, multipl sklerozlu ve serebrovasküler hasarı olan hastalarda da bulunur. E vitamini eksikliği, iskelet kası içindeki oksidatif etkilerin artması nedeniyle N-metilhistidinüriye yol açabilir. N-Metilhistidin özellikle kırmızı etin tüketimi için bir biyobelirteçtir.¹⁶ Ans (β -alanyl-1-methylhistidine) amino asidi diyetten kaynaklanabilir veya karnosinaz eksikliği olan hastalarda saptanabilir.¹⁷ Çalışmada OSB'li grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşük N-metilhistidin ve Ans düzeyleri görüldü. Çalışmada karnosinaz enzim düzeyine bakılmamıştır fakat N-metilhistidin ve Ans metabolik süreçlerdeki ilişkisi (karnosinaz enzim etkisi ile anserinin N-metilhistidin'e dönüşümü) ilginç bir durum oluşturmaktadır. Çalışmamızdaki OSB'lilerdeki Ans düşüklüğü nedeniyle NMeHis düşüklüğü olduğunu düşündürmektedir.

Aldred ve ark.'nın¹⁸ yaptıkları çalışmada Asn düzeylerini OSB'li grupta anlamlı yüksek, Bugajska ve ark.'nın¹⁹ yaptığı çalışmada anlamlı farklılık olmadığı şeklindeki yayınlara rağmen bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur.

Merkezi sinir sistemi sinaptik iletimindeki ana uyarıcı nörotransmitter olan glutamat, öğrenme, hafıza ve sinaptik plastisitedeki görevleriyle OSB'nin patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı

varsayılmaktadır.²⁰ El-Ansary²¹, El-Ansary ve Al-Ayadi'nin¹⁰ yaptıkları çalışmada OSB'li vakalarda HPLC methodu kullanılarak saptanan Glu düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (Oistik grup (n=20) 152.80 ± 76.47 $\mu\text{mol/l}$, kontrol grup (n=20) 111.91 ± 4.51 $\mu\text{mol/l}$, 7 \pm 4 yıl). Bizim çalışmamızda anlamlı derecede düşük bulunmuştur ve OSB grubuna göre kontrol grubunda Glu düzeylerindeki neredeyse iki katı kadar fark dikkate değerdir (OSB grup $46,11 \pm 26,76$ $\mu\text{mol/l}$, kontrol grup $73,47 \pm 24,36$ $\mu\text{mol/l}$).

Tirouvanziam ve ark.'nın¹¹ yaptığı çalışmada sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında OSB'li grupta Glu düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan yükseklik saptanmıştır (OSB'li grup Glu 97.2 μM , kontrol grup 74.8 μM). Ekstrasellüler Glu, beyindeki eksitotoksik kapasitesi nedeniyle OSB etiolojisinde potansiyel önemli bir faktör olarak kabul edilir. İlginç şekilde, plazma Glu seviyeleri gelişimsel olarak düzenlenir. OSB'li grupta gözlenmeyen, sağlıklı kontrol plazma Glu düzeylerinde yaşa bağlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu patern, OSB'li hastaların plazmasındaki hücre dışı Glu seviyelerinin normal gelişimsel aşağı doğru regülasyonunun bulunmadığını, daha önce bildirildiği gibi yetişkinlikte sağlıklı kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa ulaşabileceğini göstermektedir.¹¹

Zheng ve ark.'nın²² yaptığı meta-analiz ve Cai ve ark.'nın²³ yaptıkları çalışmada, kan glutamat seviyelerinin OSB'de kontrollere göre daha yüksek olduğunu ve ayrıca kan glutamat seviyelerinin OSB tanısında potansiyel bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini önermekte olsalarda, bizim çalışmamızda bu bulgularla çelişen durum söz konusudur. Kontrol grubunda plazma Glu seviyeleri OSB'li gruba göre tam tersine düşük düzeylerde saptanmıştır. Bu çalışmada diğerlerinden farklı olarak LC-MS/MS ile Glu düzeyi belirlenmiştir.

Val düzeylerinin Arnold ve ark.²⁴ ve Tu ve ark.'nın²⁵ yaptığı çalışmada sonuçlarımıza benzer olarak anlamlı düşük olduğu saptanmış fakat Tirouvanziam ve

ark.¹¹ yaptıkları çalışmada OSB'li vakalarda anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Bazı çalışmalarda dallı zincirli keto asit dehidrogenaz kinaz gendeki mutasyonların akraba evliliklerinde entellektüel yeti yitimi, otizm ve epilepsinin komorbid nedeni olduğu belirtilmiş ve bu hastalarda dallı zincirli amino asit (Leu, Ileu, Val) plazma seviyelerinin anormal derecede düşük saptandığı bildirilmiştir.^{26,27} Bu çalışmada Leu, Ileu plazma seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı fakat Val seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı. Çalışmamızdaki nöbet öyküsü olan iki vakada da Val seviyelerinin çok düşük olmaması dallı zincirli keto asit dehidrogenaz kinaz gende mutasyonu düşündürmedi.

Bugajska ve ark.'nın¹⁹ yaptığı çalışmada Cit ve Orn düzeylerinde çalışmamıza benzer olarak anlamlı düşüklük saptanmıştır. Liu ve ark.²⁸ yaptıkları çalışmada 7 uriner amino asit'in (aspartik asit, 2-aminoisobutirik asit, arginin/ornitin, 5-hidroksitriptamin, 4-hidroksiprolin, prolin) OSB'li çocuklar için potansiyel biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir ve çalışmada idrar amino asitlerine odaklanmalarını sınırlılık olarak ifade etmişlerdir. Liu ve ark.'nın²⁸ çalışması ve çalışmamızdaki plazma Orn ve Cit düzeylerinin düşük olması üre döngüsündeki bozuklukların OSB'li çocuklar için önemli olduğu ve potansiyel biyobelirteçler olabileceği kanısındayız. Üre siklus bozuklukları ile ilgili plazma ve idrar amino asitlerinin birlikte çalışılması yeni araştırmalar için tavsiye edilebilir.

Hidroksiprolin, prolinin protil hidrosilaz enzimi tarafından hidrosilasyonu yoluyla posttranslasyonel protein modifikasyonu sırasında oluşan esansiyel olmayan bir amino asit türevidir. Hidroksiprolin, protein kollajenin ana bileşenidir ve kollajen üçlü sarmalının stabilitesinde kilit bir rol oynar. Kollajen miktarını belirlemek için bir gösterge olarak kullanılabilir. İdrardaki ve/veya serumdaki artan hidroksiprolin seviyeleri normal olarak bağ dokusunun bozulması ile ilişkilendirilir. C vitamini eksikliği, prolinin

hidroksiproline dönüşümünü (kofaktör olduğundan) azaltır, bu da kollajen stabilitesinin azalmasına neden olur.²⁹ Kern ve ark.'nın³⁰ yaptıkları çalışmada OSB'li çocuklarda el kavrama gücünün hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olduğu, bu bireylerdeki kas zayıflığı ve olası tedavi hedefleri için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda OSB'li bireylerdeki Hyp'nin anlamlı düşüklüğü bu bireylerdeki kas zayıflığı ve güçsüzlüğünü açıklayabilecek bir potansiyel yaratabilir.

Sarkosin, glisin N-metil türevidir. Sarkosin, sarkosin dehidrogenaz enzimi tarafından glisine metabolize olurken glisin-N-metil transferaz, glisinden sarkosin üretir. Sarkosin, kaslarda ve diğer vücut dokularında bulunan doğal bir amino asittir.³¹ Sarkosin, kolinin glisine metabolizmasında da önemli ara maddedir.³² Sarkosin, bilinen bir toksisiteye sahip değildir.³¹

Yapılan çalışmalar sarkosinin, N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerinin glisin bağlanma bölgesinde tam bir agonist olduğunu göstermektedir.^{32,33} Yapısal olarak sarkosine benzer N, N-dimetilglisin, otistik spektrum bozuklukları için bir besin takviyesi olarak kullanılmıştır. Artan kanıtlar, NMDA reseptörlerinin uyarıcı sinapslardaki işlevsizliğinin otizm spektrum bozuklukları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. NMDA reseptörleri üzerindeki uyarıcı etkilerine dayanarak, sarkosin, şizofreni hastalarında olumsuz ve bilişsel semptomların iyileştirilmesinde ümit verici sonuçlar gösterebileceği belirtilmiştir.³²

Sarkozin düzeyine baktığımız 37 amino asitten yüksek olarak bulunan tek amino asittir. Çalışmamızda OSB'li vakalardan birinin daha önce Corteksin kullandığı fakat uzun zamandır bıraktığı, iki vakanında probiyotik ve diyet takviyeleri aldığı belirtmişlerdir. Bu üç OSB'li vakanın Sar düzeyleri çok yüksek değildi. Çalışmamızdaki bu istatistiksel anlamlı yüksekliğin söylenmeyen farklı takviyeler alınması ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Tüm vakalar için Aaa, Apa, Baib, Cth, GABA, Hista, Hyl, Thpr amino asit düzeyleri ölçüm sınırının altında kalmıştır. Özellikle

GABA düzeylerinin OSB'li bireylerde düşük olması literatürde vurgulanmıştır.^{9,34} Çalışmamızda GABA ve diğer Aaa, Apa, Baib, Cth, Hista, Hyl, Thpr ölçüm sınırının altında olan amino asitler ile ilgili literatür bilgisinin sınırlı olması ölçüm yapılan cihaz ve yöntem ile ilgili farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada 37 aminoasit çalışılması ve amino asit düzeylerinin LC-MS/MS yöntemi ile çalışılması önemli olmakla birlikte OSB'li çocuk sayısının az olması sınırlılık olarak söylenebilir. Ayrıca OSB'li çocuklardaki komorbiditeler, gıda takviyeleri ve ilaç kullanımları çalışmanın diğer sınırlılıkları olarak ifade edilebilir.

Sonuç

Literatür taraması yapıldığında OSB'li bireylerde birbiri ile çelişen amino asit düzeyleri mevcuttur. Aminositlerin metabolik ve nörotransmitter görevleri nedeniyle biyolojik sıvılardaki düzeyleri potansiyel tedavi hedefleri olması açısından son derece önem arz etmektedir. Gelişen teknoloji ile birlikte amino asit düzeyleri için doğru, duyarlı ve özgül sonuçlar elde edilmektedir. Amino asit düzeylerindeki farklılığın metodolojik veya biyolojik farklılıktan mı kaynaklandığının söylenmesi zor olmakla birlikte daha fazla çalışmanın yapılması konuyu anlaşılır kılacaktır.

Yazar katkıları: ÖA: Çalışma dizaynı, literatür araştırması, verilerin toplanması ve analizi, makale yazımı ve düzeltilmesi. BK: Verilerin toplanması, makale eleştirel değerlendirilmesi ve düzeltilmesi.

MNÖ: Literatür araştırması, verilerin analizi, makale eleştirel değerlendirilmesi ve düzeltilmesi.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Mali destek: Herhangi bir kişi, kurum veya kuruluştan mali destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Baio J, Wiggins L, Christensen D, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018;67(6):1-23. doi:10.15585/mmwr.ss6706a1
2. Howsmon D, Kruger U, Melnyk S, James S, Hahn J. Classification and adaptive behavior prediction of children with autism spectrum disorder based upon multivariate data analysis of markers of oxidative stress and DNA methylation. *PLOS Comput Biol.* 2017;13(3):e1005385. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005385
3. Cheng N, Rho J, Masino S. Metabolic Dysfunction Underlying Autism Spectrum Disorder and Potential Treatment Approaches. *Front Mol Neurosci.* 2017;10. doi: 10.3389/fnmol.2017.00034.
4. Levy S, Giarelli E, Lee L, et al. Autism Spectrum Disorder and Co-occurring Developmental, Psychiatric, and Medical Conditions Among Children in Multiple Populations of the United States. *J Dev Behav Pediatr.* 2010;31(4):267-275. doi: 10.1097/DBP.0b013e3181d5d03b
5. Dawson G, Rogers S, Munson J, et al. Randomized, Controlled Trial of an Intervention for Toddlers With Autism: The Early Start Denver Model. *Pediatrics.* 2009;125(1):e17-e23. doi: 10.1542/peds.2009-0958
6. Jo H, Schieve L, Rice C, et al. Age at Autism Spectrum Disorder (ASD) Diagnosis by Race, Ethnicity, and Primary Household Language Among Children with Special Health Care Needs, United States, 2009–2010. *Matern Child Health J.* 2015;19(8):1687-1697. doi: 10.1007/s10995-015-1683-4
7. De Rubeis S, Buxbaum J. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity. *Hum Mol Genet.* 2015;24(R1):R24-R31. doi: 10.1093/hmg/ddv273

8. Anwar A, Abruzzo P, Pasha S, et al. Advanced glycation endproducts, dityrosine and arginine transporter dysfunction in autism - a source of biomarkers for clinical diagnosis. *Mol Autism*. 2018;9(1). doi: 10.1186/s13229-017-0183-3
9. Zheng H, Wang W, Li X, Rauw G, Baker G. Body fluid levels of neuroactive amino acids in autism spectrum disorders: a review of the literature. *Amino Acids*. 2016;49(1):57-65. doi: 10.1007/s00726-016-2332-y
10. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1). 189. doi: 10.1186/s12974-014-0189-0
11. Tirouvanziam R, Obukhanych T, Laval J, et al. Distinct Plasma Profile of Polar Neutral Amino Acids, Leucine, and Glutamate in Children with Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2011;42(5):827-836. doi:10.1007/s10803-011-1314-x
12. Robertson C, Ratai E, Kanwisher N. Reduced GABAergic Action in the Autistic Brain. *Curr Biol*. 2016;26(1):80-85. doi:10.1016/j.cub.2015.11.019
13. Cochran D, Sikoglu E, Hodge S, et al. Relationship among Glutamine, γ -Aminobutyric Acid, and Social Cognition in Autism Spectrum Disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2015;25(4):314-322. doi:10.1089/cap.2014.0112
14. Dawson G, Rogers S, Munson J, et al. Randomized, Controlled Trial of an Intervention for Toddlers With Autism: The Early Start Denver Model. *Pediatrics*. 2009;125(1):e17-e23. doi:10.1542/peds.2009-0958
15. Ganz M. The Lifetime Distribution of the Incremental Societal Costs of Autism. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161(4):343-349. doi:10.1001/archpedi.161.4.343
16. Pubchem. 1-Methyl-L-histidine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92105>. 02 Mayıs 2019 tarihinde erişilmiştir.
17. Mayatepek E and Jaeken J. Disorders in the Metabolism of Glutathione and Imidazole Dipeptides. İçinde: Saudubray J-M, van den Berghe G, Walter JH, ed. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 5. baskı. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2012: 423-430.
18. Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH. Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *J Autism Dev Disord*. 2003;33(1):93-97. doi:10.1023/a:1022238706604. doi:10.1023/a:1022238706604
19. Bugajska J, Berska J, Wojtyto T, Bik-Multanowski M, Sztefko K. The amino acid profile in blood plasma of young boys with autism. *Psychiatr Pol*. 2017;51(2):359-368. doi:10.12740/PP/65046
20. Yang P, Chang C. Glutamate-Mediated Signaling and Autism Spectrum Disorders: Emerging Treatment Targets. *Curr Pharm Des*. 2014;20(32):5186-5193. doi:10.2174/1381612819666140110120725
21. El-Ansary A. Data of multiple regressions analysis between selected biomarkers related to glutamate excitotoxicity and oxidative stress in Saudi autistic patients. *Data Brief*. 2016;7:111-116. doi:10.1016/j.dib.2016.02.025
22. Zheng Z, Zhu T, Qu Y, Mu D. Blood Glutamate Levels in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158688. doi:10.1371/journal.pone.0158688
23. Cai J, Ding L, Zhang J, Xue J, Wang L. Elevated plasma levels of glutamate in children with autism spectrum disorders. *NeuroReport*. 2016;27(4):272-276. doi:10.1097/WNR.0000000000000532

24. Arnold G, Hyman S, Mooney R, Kirby R. Plasma amino acids profiles in children with autism: potential risk of nutritional deficiencies. *J Autism Dev Disord.* 2003;33(4):449-454. doi:10.1023/a:1025071014191
25. Tu W, Chen H, He J. Application of LC-MS/MS analysis of plasma amino acids profiles in children with autism. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;51(3):248-249. doi:10.3164/jcbn.12-45
26. Novarino G, El-Fishawy P, Kayserili H, Meguid N, Scott E et al. Mutations in BCKD-kinase Lead to a Potentially Treatable Form of Autism with Epilepsy. *Science.* 2012;338(6105):394-397. doi:10.1126/science.1224631
27. García-Cazorla A, Oyarzabal A, Fort J, et al. Two Novel Mutations in the BCKDK (Branched-Chain Keto-Acid Dehydrogenase Kinase) Gene Are Responsible for a Neurobehavioral Deficit in Two Pediatric Unrelated Patients. *Hum Mutat.* 2014;35(4):470-477. doi:10.1002/humu.22513
28. Liu A, Zhou W, Qu L et al. Altered Urinary Amino Acids in Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:7. doi:10.3389/fncel.2019.00007
29. Pubchem. L-Hydroxyproline. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54196981>. 03 Mayıs 2019 tarihinde erişilmiştir.
30. Kern J, Geier D, Adams J, Troutman M, Davis G, King P et al. Autism severity and muscle strength: A correlation analysis. *Research in Autism Spectrum Disorders.* 2011;5(3):1011-1015 doi:10.1016/j.rasd.2010.11.002.
31. Pubchem. Sarcosine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1088>. 02 Mayıs 2019 tarihinde erişilmiştir.
32. Lee M, Lin Y, Tu Y, et al. Effects of sarcosine and N, N-dimethylglycine on NMDA receptor-mediated excitatory field potentials. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):18. doi:10.1186/s12929-016-0314-8
33. Zhang HX, Hyrc K, Thio LL. The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *J Physiol.* 2009;587(13):3207-3220. doi:10.1113/jphysiol.2009.168757
34. Schür RR, Draisma LW, Wijnen JP, et al. Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(9):3337-3352. doi:10.1002/hbm.23244