

Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Çocuklarda Serum USP9X ve TGF- β Düzeylerinin Sağlıklı Kontrollerle Karşılaştırılması

Comparison of Serum USP9x and TGF- β Levels in Children with Autism Spectrum Disorders with Healthy Controls

Mehmet KARADAĞ¹, Fatma SUBAŞI TURGUT², Zehra ÇİFTÇİ¹, Zehra HANGÜL¹, Seyithan TAYSI³

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

³Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

ÖZ

Amaç: USP9X, sinaptik gelişim ve nöral fonksiyondaki rolü nedeniyle nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmanın amacı otizmlili çocuklarda ve sağlıklı kontrollerde USP9X ve TGF- β düzeylerini karşılaştırmak ve otizm şiddeti ile ilişkilerini araştırmaktır.

Yöntemler: Serum USP9X ve TGF- β düzeyleri 41 sağlıklı kontrol (3–12 yaş) ve 41 otizmlili çocukta ölçülmüştür.

Bulgular: Çalışmamız USP9X düzeylerinde otizmlili çocuklarda kontrollere kıyasla anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur ($p=0,001$). Ancak, TGF- β düzeyleri iki grup arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Ayrıca, göz teması kurmada zorluk alt ölçeği ile hem USP9X hem de TGF- β kan seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır.

Sonuçlar: Bu çalışma, otizmlili çocuklarda serum USP9X düzeylerini sağlıklı kontrollerle karşılaştıran ilk çalışmadır. Bulgularımız, USP9X'in otizm gelişimindeki potansiyel rolünü ortaya koymakta ve nörogelişimsel süreçlere katılımı konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Otizm, USP9X, TGF- β , Etiyoloji

ABSTRACT

Introduction: USP9X has been associated with neurodevelopmental disorders due to its role in synaptic development and neural function. This study aimed to compare USP9X and TGF- β levels in children with autism and healthy controls, and explore their relationship with autism severity.

Methods: Serum USP9X and TGF- β levels were measured in 41 healthy control children (aged 3–12 years) and 41 children with autism.

Results: Our study revealed a significant increase in USP9X levels ($p=0.001$) among children with autism compared to controls. However,

TGF- β levels showed no significant difference between the two groups. Furthermore, we observed a positive correlation between difficulty in making eye contact subscale and blood levels of both USP9X and TGF- β .

Conclusions: This study is the first to compare serum USP9X levels in children with autism to healthy controls. Our findings suggest USP9X's potential role in autism development, emphasizing the need for further research on its involvement in neurodevelopmental processes.

Keywords: Autism, USP9X, TGF- β , Etiology

Cite this article as: Karadağ M, Subaşı Turgut F, Çiftçi Z, Hangül Z, Taysi S. Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Çocuklarda Serum USP9X ve TGF- β Düzeylerinin Sağlıklı Kontrollerle Karşılaştırılması. Arch Neuropsychiatry 2024; 61:306–312.

GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal beceri eksikliği, sözlü ve sözsüz iletişim bozuklukları, sınırlı ve basmakalıp ilgi alanları ve faaliyetlerle karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Erkeklerde görülme olasılığı kadınlara göre dört kat daha fazladır (1). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin son tahminleri, Amerikalı çocuklar arasında otizmin yaygınlığının iki yıl önce 44'te bir (%2,3) iken 36'da bir veya yaklaşık %2,8'e yükseldiğini göstermektedir (2). Otizmin etiyojisi çok faktörlü olsa da, araştırmalar otizmin etiyojisinde güçlü bir genetik bileşene işaret etmektedir. Sinaptik işlev ve nöronal bağlantı ile ilgili bazı genlerdeki mutasyonlar veya varyasyonlar, otizm gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (3).

Son çalışmalar, protein döngüsünün OSB'de önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (4). Protein homeostazı, hücrelerin fizyolojik protein seviyelerini koruduğu bir mekanizmadır ve anormal nöronal homeostaz, anormal protein seviyelerine ve aşırı protein agregasyonu ile ilişkili bozukluklara yol açar. Homeostazın ana mekanizmalarından biri, ubiquitin-proteazom sistemi tarafından protein bozunması olan ubiquitilasyondur; diğeri ise ubiquitini proteinlerden uzaklaştırarak bu sürece karşı çıkan deubikitilasyon sistemidir (5). Ubikitilasyon, 76 amino asitten oluşan ubiquitin protein yapısına eklenmesiyle oluşan post-translasyonel bir modifikasyondur. Hücrelerde, ubiquitin sistemi çok sayıda kısa ömürlü proteinin parçalanmasından sorumludur. Proteinlerin ubiquitine kovalent

Öne Çıkan Noktalar

- Otizm tanısı olan ve sağlıklı olan grupta USP9X ve TGF-β düzeylerini araştırdık.
- Çalışmamız otizmde serum USP9X düzeylerini değerlendiren ilk çalışmadır.
- TGF-β düzeyleri iki grup arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.
- USP9X düzeyleri otizmlı grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- USP9X ve otizm arasındaki ilişki önemli bir araştırma konusu olabilir.

bağlanması, parçalanma için hedef noktada olmalarını sağlar. Hücre döngüsü, sinyal iletimi, transkripsiyonel düzenleme, reseptör aracılı düzenleme, sinaptik yeniden şekillenme ve endositoz gibi birçok aktivite ubiquitin sistemi tarafından düzenlenir (6). Ubikitin sistemi ve proteinler arasındaki yakın bağlantı nedeniyle, bu sistemin bozulması nörogelişimsel bozukluklara neden olabilir (7).

Deubikitinasyon, deubikitinasyon enzimlerinin ubiquitinlenmiş proteinlerden ubiquitini uzaklaştırdığı ve ubiquitinasyon olayını tersine çevirdiği bir süreçtir (8). Deubikitle enzimler (DUB), ubiquitin substrat proteine bağlanmasını inhibe ederek ubiquitin-substrat protein ilişkisini tersine çevirir. İnsan genomu yaklaşık 95 DUB kodlar. Substrata özgü proteaz (USP) en büyük sınıftır ve hücre faaliyetleri hassas bir şekilde yönetir (9). Usp9x büyük bir DUB'dir (2554 amino asit) (10). USP9X, bir deubikitinleştirici enzimi (DUB) kodlayan oldukça korunmuş bir X-kromozom genidir. X'e bağlı USP9X geni, bir UBL (ubikitin benzeri) alanı ve katalitik bir ubiquitin spesifik proteaz (USP) alanı ile yapısal ve işlevsel olarak korunmuş bir deubikitinasyon enzimini kodlar (11). Usp9x proteini ratlarda sinapslarda lokalizedir ve memeli sinaptik gelişimindeki işlevini gösterir (12). Hem insan hem de ratların nöral gelişiminde önemli bir işlevi olduğu ve fetal gelişim için gerekli olduğu bilinmektedir. USP9X ekspresyonu embriyogenez sırasında en yüksek seviyededir (11). USP9X yetişkin merkezi sinir sisteminde azaldığında bile, lateral ventriküllerin sub-ventriküler bölgesi ve dentat girusun sub-granüler bölge hücreleri gibi nörojenik bölgelerde güçlü bir şekilde ifade edilmeye devam eder (13).

USP9X'in birkaç önemli substratı, homeostaz ve/veya beyin gelişimi ile ilgili süreçleri kontrol eder. Bunlardan Notch, Wnt ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β) nörogelişimsel sinyal yollarının unsurlarını içerir (10). Embriyonik ön beyinde USP9X'in silinmesi, kusurlu nöral progenitör hücre işlevi ve kusurlu hücre olgunlaşması ile sonuçlanır (14).

TGF-β sitokinleri büyüme faktörlerine dönüştüren bir proteindir. Özellikle bağışıklık sistemi için çok önemli bir sitokindir, ancak bağışıklık dışı işlevlerle de bağlantılıdır (15). TGF, hücre içi fosforilasyon yapan serin/treonin kinazlar olan TGF reseptörleri I ve II'ye bağlanır (16). Nöroprotektif faktör TGF-β, USP9X'in fosforilasyonuna ve ardından dikenlerde ankyrin-G'nin stabilizasyonuna neden olan bir sinyal kaskadı başlatır. USP9X'in ankyrinG ile etkileşime girmesi ve stabilitesini düzenlemesi dendritik dikenleri korur (16). TGF-β, Ankyrin-G ve USP9X'in subsinaptik lokalizasyonunu kontrol eder. Böylece TGF-β'nin nöronal büyüme ve işlevde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. TGF-β, nörogelişimsel hastalıklarda sinaptik eksiklikleri onarmak için terapötik bir yöntem olarak kullanılabilir (16). USP9X, TGF-β sinyal yolunun kritik bir düzenleyicisidir. TGF stimülasyonuna yanıt olarak USP9X dendritik oluşumu ve nöronal aksonal büyümeyi kontrol eder (17).

Sinaptik fonksiyon ve protein homeostazının otizm etiolojisindeki rolüne ilişkin son literatür göz önüne alındığında, protein homeostatik fonksiyonunun ana mekanizmalarından biri olan USP9X, sinaptik fonksiyondaki rolü ile dikkat çekmektedir ve OSB'li çocuklarda henüz çalışılmamıştır. Çalışmamızda, otizmlı çocuklar ile sağlıklı kontroller arasında USP9X ve potansiyel olarak ilişkili TGF-β seviyelerini karşılaştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Katılımcılar

Bu çalışma, Otizm Spektrum Bozukluğu olan çocuklarda ve sağlıklı kontrollerde serum TGF-β ve USP9X düzeylerini karşılaştırmayı amaçlayan kesitsel bir çalışmadır. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Tıbbi Etik Kurulu'ndan 12.01.2022 tarihinde 2021/347 karar numarası ile onay alınmıştır. Ocak-Mart 2022 tarihleri arasında Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Polikliniği'ne başvuran hastalar arasından çalışmaya dâhil edilme kriterlerini karşılayan hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. DSM-5 ölçütlerine göre OSB tanısı alan ve 3-12 yaş aralığında olan hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Son 2 hafta içinde psikotrop ilaçlar dışında herhangi bir ilaç kullanan, antienflamatuvar ve antioksidan ajanlar alan, akut veya bilinen herhangi bir kronik metabolik hastalığı, genetik hastalığı, nörolojik hastalığı, kardiyovasküler hastalığı, solunum hastalığı, karaciğer veya böbrek hastalığı, onkolojik hastalığı, hematolojik hastalığı, enfektif hastalığı, otoimmün hastalığı, alerjik hastalığı veya tıbbi hastalığı olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Kontrol grubu, bilinen herhangi bir tıbbi veya psikiyatrik hastalığı olmayan kişilerden seçilmiştir.

Ölçümler

Otizm spektrum bozukluğu olan çocukların ve kontrol grubundaki çocukların ebeveynleri çalışmaya katılmak için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formlarını imzalamışlardır. Kontrol grubundaki altı yaş üstü okuyazar çocuklar da bilgilendirilmiş onam vermişlerdir. Her iki grup da bir çocuk psikiyatristi tarafından değerlendirilmiş ve ebeveynlerden sosyodemografik veriler toplanmıştır.

Sosyo-demografik Form Yarı yapılandırılmış bir görüşme çizelgesi kullanılarak OSB'li ve sağlıklı çocukların yaşları ve gelişim evreleri, ebeveynlerinin yaşları ve çalışma durumları ve ebeveynlerinde psikopatoloji varlığı sorgulanmıştır.

Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklar için Çocukluk Otizmi Derecelendirme Ölçeği (CARS) hem ebeveynlere sorularak hem de çocuk gözlemlenerek elde edilen bilgilere dayanarak klinisyen tarafından doldurulmuştur (18). CARS, otizm tanısında yaygın olarak kullanılan geçerli ve güvenilir bir ölçektir. CARS, otizm tanısı koymanın yanı sıra OSB olmayan gelişimsel yetersizliği olan çocukları OSB olan çocuklardan ayırt etmek için geliştirilmiş 15 maddelik bir ölçektir. Ölçekte yer alan maddeler insanlarla ilişki, taklit, duygusal tepkiler, beden kullanımı, değişime tepki, görsel tepkiler, dinlenme tepkileri, tat, koku ve dokunma kullanımı, korku/sinirlilik, sözel iletişim, sözel olmayan iletişim, zihinsel aktiviteler ve genel izlenimler başlıkları altında toplanmıştır. Çocukluk otizmi derecelendirme ölçeği ülkemizde geçerliliği ve güvenilirliği kanıtlanmış bir ölçektir (19).

Gilliam Otizm Derecelendirme Ölçeği-2'nin (TV-GARS-2) Türkçe versiyonu OSB'li çocukların ebeveynlerinden biri (anne veya baba; çocuğu daha iyi tanıyan ebeveyn tercih edilmiştir) tarafından doldurulmuştur. TV-GARS-2, Stereotipik Davranışlar, İletişim ve Sosyal Etkileşim olmak üzere üç alt ölçekten ve spesifik, gözlemlenebilir ve ölçülebilir davranışları içeren maddelerden oluşmaktadır. TV-GARS-2'nin değerlendirilmesi sonucunda Otistik Bozukluk İndeksi adı verilen standart bir puan elde edilir (20). TV-GARS-2'nin Türkçe versiyonu geçerli ve güvenilir bir ölçektir (21).

Kan Örneklerinin Alınması ve Laboratuvar Çalışmaları

Kan, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan alma biriminde gönüllülerden toplanmıştır. Kan örnekleri sarı uçlu vakumlu plastik jelli tüpe yerleştirilmiş ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serum ayrılması ve analiz dönemine kadar -80 santigrat derecede saklanmıştır. TGF-β ve USP9X düzeyleri Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Bölümünde belirlenmiş ve örnekler tamamlandıktan sonra hazır bir kit ile ELISA yaklaşımı kullanılarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler için tanımlayıcı istatistik olarak frekans ve yüzde analizi kullanılırken, sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapma verilmiştir. USP9X ve TGF-β değişkenlerinin normal dağılımları üzerinde Shapiro-Wilk testleri yapılmıştır. Bu değişkenleri kategorik değişkenlerle karşılaştırmak için Paired-Student T-test/Mann-Whitney-U test karşılaştırması kullanılmıştır. İki gruplu kategorik değişkenler için U testi, üç veya daha fazla gruplu kategorik değişkenler için Varyans Analizi/Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Çalışma sonuçları normal dağılım göstermeyen değişkenler için medyan (Q1-Q3), normal dağılım gösterenler için ise ortalama ve standart sapma olarak gösterilmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıkları incelemek için ayrıca ki-kare analizi yapılmıştır. Ayrıca, sayısal değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi kullanılarak incelenmiştir. Analizler IBM Sosyal Bilimlerde İstatistik Paket Programı (SPSS) sürüm 22.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık eşiği $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Örneklem grubu 3-12 yaş arası 41 OSB'li çocuk ve aynı yaş grubundan 41 sağlıklı çocuk olmak üzere toplam 82 bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması 7,83 ($\pm 2,37$), vaka grubunun yaş ortalaması ise 7,20 ($\pm 2,66$) olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Cinsiyet dağılımı incelendiğinde 82 çocuğun 65'i (%79,2) erkek, 17'si (%19,1) kızdır. Erkek/kadın oranı 4/1'dir. Çocuklar cinsiyet açısından değerlendirildiğinde vaka ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Katılımcıların anne ve babalarında psikiyatrik hastalık olup olmamasına göre iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Vaka ve kontrol gruplarının birinci derece akrabaları psikiyatrik hastalık durumları açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Vaka ve kontrol grupları ailede OSB varlığı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Kontrol grubundaki katılımcıların 1'inin (%2,5) ailesinde OSB öyküsü varken, 40'ının (%97,5) ailesinde OSB öyküsü bulunmamaktadır. Vaka grubundaki katılımcıların 10'unun (%24,3) ailesinde OSB öyküsü varken, 31'inin (%75,7) ailesinde OSB öyküsü yoktur. Verilerin devamı Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

TV-GARS-2'deki Otistik Bozukluk İndeksine karşılık gelen puanlara göre bir (%2,5) hastada OSB olasılığı düşük, üç (%7,3) hastada OSB olasılığı yüksek, dokuz (%21,9) hastada OSB olasılığı yüksek (hafif düzeyde), 17 (%41,4) hastada OSB olasılığı çok yüksek (orta düzeyde) ve 11 (%26,8) hastada OSB olasılığı çok yüksek (ağır düzeyde) bulunmuştur. Klinisyen

Tablo 1. Katılımcıların sosyodemografik bilgilerinin karşılaştırılması

	Hasta	Kontrol	P
Yaş*	7,20 ($\pm 2,66$)	7,83 ($\pm 2,37$)	0,259
Cinsiyet**			0,173
Kadın	6 (%14,6)	11 (%26,8)	
Erkek	35 (%85,4)	30 (%73,2)	
Gelişim basamakları (konuşma, yürüme, tuvalet eğitimi)***			<0,001
Zamanında	4 (%9,8)	38 (%92,7)	
Gecikmiş	37 (%90,2)	3 (%7,3)	
Annede psikiyatrik hastalık**			0,785
Yok	33 (%80,5)	32 (%78,0)	
Var	8 (%19,5)	9 (%22,0)	
Babada psikiyatrik hastalık***			0,131
Yok	32 (%78,0)	37 (%90,2)	
Var	9 (%22,0)	4 (%9,8)	
Birinci derece akrabalarda psikiyatrik hastalık**			0,015
Yok	16 (%39)	27 (%65,9)	
Var	25 (%61)	14 (%34,1)	
Ailede OSB öyküsü olması***			0,004
Yok	31 (%75,6)	40 (%97,6)	
Var	10 (%24,4)	1 (%2,4)	
Ailede DEHB öyküsü olması**			0,135
Yok	27 (%65,9)	33 (%80,5)	
Var	14 (%34,1)	8 (%19,5)	

DEHB: dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu; OSB: otizm spektrum bozukluğu; * Bağımsız T-Testi; **Ki-kare; *** Fisher's testi.

Tablo 2. CARS ve TV-GARS-2'ye göre vakaların otizm şiddeti

		n	%
TV-GARS-2 toplam puan Karar rehberi CARS sonucu CARS sonucu	OSB* görülme olasılığı var	1	2,4
	OSB görülme olasılığı var	3	7,3
	OSB olasılığı oldukça yüksek - düşük	9	21,9
	OSB olasılığı oldukça yüksek - orta	17	41,5
	OSB olasılığı oldukça yüksek - ağır	11	26,9
	Düşük-orta 32,15 (±6,7) Aşırı otistik 37,6 (±5,9)	18 23	43,9 56,1

OSB: otizm spektrum bozukluğu; CARS: çocukluk otizmi derecelendirme ölçeği; TV-GARS-2: Gilliam otizm derecelendirme ölçeği-2'nin Türkçe versiyonu.

Tablo 3. Hasta ve kontrol grupları arasında USP9X ve TGF-β değerlerinin karşılaştırılması

	Hasta	Kontrol	P
USP9X (ng/ml)	11,94 (10,41-13,48)	8,77 (7,27-10,26)	0,001
TGF-β (pg/ml)	466,28 (420,18-512,37)	503,93 (461,48-546,38)	0,209

Mann-Whitney U test.

Tablo 4. CARS soruları ile TGF-β ve USP9X arasındaki korelasyon

	US	TG	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	CT	
US	r	1	0,162	-0,058	0,137	-0,009	-0,280	-0,139	0,100	0,337*	-0,010	0,120	-0,182	-0,194	-0,083	0,049	-0,218	-0,049	-0,075
	p		0,145	0,721	0,392	0,953	0,076	0,386	0,534	0,031	0,951	0,454	0,254	0,225	0,607	0,761	0,171	0,763	0,639
TG	r	0,162	1	0,009	0,095	-0,042	-0,070	-0,077	-0,051	0,390*	0,117	-0,126	0,207	0,012	0,180	0,085	-0,057	-0,149	0,042
	p	0,145		0,956	0,553	0,796	0,663	0,631	0,752	0,012	0,466	0,434	0,193	0,942	0,261	0,596	0,721	0,354	0,793
C1	r	-0,058	0,009	1	0,490**	0,363*	0,450**	0,542**	0,148	0,182	0,308	0,195	0,171	0,408**	0,523**	0,042	0,345*	0,546**	0,659**
	p	0,721	0,956		0,001	0,020	0,003	0,000	0,354	0,256	0,050	0,221	0,285	0,008	0,000	0,797	0,027	0,000	0,000
C2	r	0,137	0,095	0,490**	1	0,172	0,399**	0,556**	0,126	0,494**	0,515**	0,303	-0,037	0,274	0,539**	-0,258	0,608**	0,617**	0,665**
	p	0,392	0,553	0,001		0,283	0,010	0,000	0,433	0,001	0,001	0,054	0,818	0,083	0,000	0,103	0,000	0,000	0,000
C3	r	-0,009	-0,042	0,363*	0,172	1	0,350*	0,620**	0,426**	0,140	0,140	0,523**	0,315*	0,222	0,235	0,262	0,099	0,463**	0,628**
	p	0,953	0,796	0,020	0,283		0,025	0,000	0,005	0,382	0,384	0,000	0,045	0,163	0,139	0,098	0,537	0,002	0,000
C4	r	-0,280	-0,070	0,450**	0,399**	0,350*	1	0,456**	0,028	0,123	0,232	0,300	0,067	0,368*	0,404**	0,003	0,343*	0,539**	0,606**
	p	0,076	0,663	0,003	0,010	0,025		0,003	0,861	0,445	0,145	0,057	0,677	0,018	0,009	0,986	0,028	0,000	0,000
C5	r	-0,139	-0,077	0,542**	0,556**	0,620**	0,456**	1	0,230	0,278	0,275	0,469**	0,102	0,498**	0,588**	0,117	0,448**	0,707**	0,821**
	p	0,386	0,631	0,000	0,000	0,000	0,003		0,147	0,079	0,082	0,002	0,526	0,001	0,000	0,466	0,003	0,000	0,000
C6	r	0,100	-0,051	0,148	0,126	0,426**	0,028	0,230	1	0,101	0,087	0,291	0,271	-0,089	0,054	0,175	0,041	0,323*	0,378*
	p	0,534	0,752	0,354	0,433	0,005	0,861	0,147		0,530	0,589	0,065	0,087	0,580	0,738	0,272	0,798	0,039	0,015
C7	r	0,337*	0,390*	0,182	0,494**	0,140	0,123	0,278	0,101	1	0,694**	0,097	-0,126	0,199	0,315*	-0,076	0,141	0,406**	0,442**
	p	0,031	0,012	0,256	0,001	0,382	0,445	0,079	0,530		0,000	0,548	0,432	0,212	0,045	0,635	0,379	0,009	0,004
C8	r	-0,010	0,117	0,308	0,515**	0,140	0,232	0,275	0,087	0,694**	1	0,023	-0,035	0,191	0,415**	-0,213	0,258	0,534**	0,502**
	p	0,951	0,466	0,050	0,001	0,384	0,145	0,082	0,589	0,000		0,886	0,829	0,231	0,007	0,180	0,104	0,000	0,001
C9	r	0,120	-0,126	0,195	0,303	0,523**	0,300	0,469**	0,291	0,097	0,023	1	0,294	-0,029	0,140	-0,094	0,409**	0,425**	0,512**
	p	0,454	0,434	0,221	0,054	0,000	0,057	0,002	0,065	0,548	0,886		0,062	0,859	0,384	0,560	0,008	0,006	0,001
C10	r	-0,182	0,207	0,171	-0,037	0,315*	0,067	0,102	0,271	-0,126	-0,035	0,294	1	0,031	0,147	0,091	0,188	0,098	0,288
	p	0,254	0,193	0,285	0,818	0,045	0,677	0,526	0,087	0,432	0,829	0,062		0,846	0,360	0,571	0,240	0,540	0,067
C11	r	-0,194	0,012	0,408**	0,274	0,222	0,368*	0,498**	-0,089	0,199	0,191	-0,029	0,031	1	0,561**	0,053	0,394*	0,520**	0,546**
	p	0,225	0,942	0,008	0,083	0,163	0,018	0,001	0,580	0,212	0,231	0,859	0,846		0,000	0,744	0,011	0,000	0,000
C12	r	-0,083	0,180	0,523**	0,539**	0,235	0,404**	0,588**	0,054	0,315*	0,415**	0,140	0,147	0,561**	1	0,056	0,609**	0,688**	0,734**
	p	0,607	0,261	0,000	0,000	0,139	0,009	0,000	0,738	0,045	0,007	0,384	0,360	0,000		0,729	0,000	0,000	0,000
C13	r	0,049	0,085	0,042	-0,258	0,262	0,003	0,117	0,175	-0,076	-0,213	-0,094	0,091	0,053	0,056	1	-0,230	-0,014	0,161
	p	0,761	0,596	0,797	0,103	0,098	0,986	0,466	0,272	0,635	0,180	0,560	0,571	0,744	0,729		0,147	0,929	0,316
C14	r	-0,218	-0,057	0,345*	0,608**	0,099	0,343*	0,448**	0,041	0,141	0,258	0,409**	0,188	0,394*	0,609**	-0,230	1	0,645**	0,615**
	p	0,171	0,721	0,027	0,000	0,537	0,028	0,003	0,798	0,379	0,104	0,008	0,240	0,011	0,000	0,147		0,000	0,000
C15	r	-0,049	-0,149	0,546**	0,617**	0,463**	0,539**	0,707**	0,323*	0,406**	0,534**	0,425**	0,098	0,520**	0,688**	-0,014	0,645**	1	0,888**
	p	0,763	0,354	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,039	0,009	0,000	0,006	0,540	0,000	0,000	0,929	0,000		0,000
CT	r	-0,075	0,042	0,659**	0,665**	0,628**	0,606**	0,821**	0,378*	0,442**	0,502**	0,512**	0,288	0,546**	0,734**	0,161	0,615**	0,888**	1
	p	0,639	0,793	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,004	0,001	0,001	0,067	0,000	0,000	0,316	0,000	0,000	

C: CARS; CT: CARS toplam skoru; TG: TGF-β; US: USP9X. Spearman korelasyon testi.

tarafından doldurulan CARS skorlarına göre, 18 (%43,9) hasta hafif-orta ve 23 (%56,1) hasta ağır OSB skorlarını karşılamıştır (Tablo 2).

OSB'li çocuklar ile sağlıklı kontroller arasında USP9X ve TGF-β düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda, USP9X düzeyinin OSB'li çocuklarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($p: 0,001$), TGF-β düzeyinin ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur (Tablo 3). Olguların CARS ve TV-GARS-2 skorları ile USP9X ve TGF-β değerleri arasındaki korelasyon analizinde, CARS'ın 7. sorusu olan Görsel tepki alt ölçeği dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Görsel yanıt alt ölçeği ile USP9X ($r=0,337$, $p=0,031$) ve TGF-β ($r=0,390$, $p=0,012$) arasında orta düzeyde pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Tablo 4). Bu sonuca göre, hastaların göz temasları anormalleştikçe USP9X ve TGF-β değerlerinin arttığı görülmüştür.

TARTIŞMA

Çalışmamızda USP9X ve TGF-β düzeyleri vaka ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında, vaka grubunda USP9X düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunurken, TGF-β düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda, göz temasının azalması ile USP9X ve TGF-β seviyelerinin artması arasında da bir bağlantı keşfettik.

USP9X, lissensefali, epilepsi, X'e bağlı zihinsel engellilik ve otizm spektrum bozukluklarını içeren insan nörogelişimsel bozuklukları için potansiyel bir genidir (22). Literatüre bakıldığında, otizme neden olan karmaşık süreçlerin anlaşılmasında potansiyel oyuncular olarak TGF-β ve USP9X'e dikkat çekilmiştir, ancak bu alanda çok az çalışma olduğu görülmektedir.

Bu alanda fareler üzerinde yapılan çalışmalar, anlayışımızı genişletmede merkezi bir rol oynamıştır. Örneğin bir hayvan çalışmasında, USP9X eksikliği olan farelerin en belirgin fenotipi, yetişkin hipokampusünün boyutundaki dramatik azalma olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada, USP9X'in yokluğunda beyin genel mimarisinin normal geliştiği, ancak korpus kallozum ve hipokampal boyutların azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca USP9X yokluğunun aksonal uzunlukta dramatik azalmalara yol açtığını belirtmiş ve bunu TGF-β sinyalizasyonundaki bir başarısızlığa bağlamıştır (10). Ön beyne özgü USP9X nakavt farelerin (USP9X^{-/-}) analiz edildiği bir hayvan çalışmasında, araştırmacılar USP9X^{-/-} farelerin anormal iletişim ve sosyal etkileşim davranışları sergilediğini kaydetmiştir. Buna karşılık, USP9X^{-/-} farelerinde tekrarlayan davranışların gözlenmediğini belirtmişlerdir (23).

Başka bir hayvan çalışmasında, USP9X'ten yoksun fareler dentat girus boyutunda dramatik bir azalma göstermiş ve daha küçük bir hipokampus sahip oldukları bulunmuştur. Bu çalışmada USP9X eksikliği olan farelerin dentat girusundaki hüresel popülasyonlar analiz edildiğinde, azalmış kök hücreler ve azalmış nöroblastlar ile anormal nöroblast morfolojisi tespit edilmiştir (24). Bu çalışmalar USP9X'in postnatal hipokampusün normal morfolojik gelişiminde oynadığı kritik rolü vurgulamaktadır. Çalışmalar, OSB'li bireylerde hipokampal aktivitenin bozulduğunu göstermiştir. Hipokampus, otizmde bozulmuş olan sosyal etkileşim, hafıza ve uzamsal muhakemede kritik roller oynamaktadır (25). Bu bulgular göz önüne alındığında USP9X ile otizm arasındaki ilişkinin önemli bir çalışma konusu olduğunu düşünüyoruz ancak literatüre baktığımızda bu alanda büyük bir bilgi boşluğu olduğunu görüyoruz. USP9X ve zihinsel engellilik arasındaki ilişki kısmen çalışılmış olsa da, USP9X ve otizm arasındaki ilişki hâlâ belirsizdir.

USP9X'teki mutasyonların, insanlar da dâhil olmak üzere memelilerde nörogelişimsel sorunlara neden olduğu düşünülmektedir. Zihinsel engellilik, otizm, epilepsi ve lissensefali, USP9X işlevinin kaybıyla ilişkilendirilmiştir (24).

Literatür incelendiğinde, USP9X'in hem erkeklerde hem de kadınlarda gelişimsel gecikme/zihinsel engellilik de dâhil olmak üzere nörogelişimsel sorunlarla ilişkili olduğu ve beyin gelişimi sırasındaki rolüyle tutarlı olarak çeşitli kalıtım modelleri ve klinik belirtiler gösterdiği görülmüştür (14,26). X'e bağlı zihinsel yetersizliği olan bir ailede hastalıkla ilişkili USP9X'teki truncating bir mutasyonla ilgili bir rapor yayımlanmıştır (27). USP9X mutasyonlarına sahip toplam beş bireyin dâhil edildiği bir çalışmada, beş bireyin tamamında zihinsel engellilik ve beş bireyin ikisinde zihinsel engellilik ile birlikte otizm bulunmuştur. USP9X'teki mutasyonların işlevsel bir etkiye sahip olduğu ve zihinsel engelliliğe neden olduğu bildirilmiştir (22).

De Laurentiis ve ark. (2023), USP9X'te yanlış anlamlı bir varyantı olan klasik nörogelişimsel fenotipe sahip 5 yaşında bir erkek çocuk bildirmiştir. Daha önce bildirilmemiş bir periventriküler heterotopi radyolojik tablosuyla sunulan bu vaka, USP9X'in kortikal mimari ve nöral göç organizasyonundaki kritik rolünü ve USP9X nörogelişimsel hastalığının X'e bağlı bir formunun varlığını vurgulamıştır (28). Otizmlili 19 vaka ve bu vakaların her iki ebeveynini de içeren 19 üçlü gruptan oluşan bir kohortta risk genlerini/nadir varyantları belirlemek için tüm-ekzom dizilemesi yapılmış ve USP9X geninin diğer birçok genle birlikte otizmle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (29).

USP9X üzerine yapılan hayvan ve çok sınırlı insan çalışmaları, USP9X mutasyonu ile otizm arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Literatürün aksine, çalışmamızdaki USP9X seviyeleri otizmlili bireylerde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek saptandı. Bu durum küçük örneklem grubumuzun farklılıkları tespit etme yeteneğimizi sınırlandırmış olması ile ilişkili olabilir. Çalışmalarda zihinsel engelliliğin sıklıkla USP9X işlev kaybı mutasyonları ile ilişkili saptandığı göz önüne alındığında, bu çalışmada zihinsel engellilik derecesi ile USP9X arasındaki ilişkinin incelenmemiş olması da çalışmamızın önemli bir kısıtlılığıdır. Ayrıca USP9X'in cinsiyete göre farklı sonuçlara sahip olması da sonuçları yorumlamamızı zorlaştırmış gibi görünmektedir. USP9X'in X kromozomu üzerinde yer aldığını biliyoruz. X'e bağlı bozuklukların kalıtım şekilleri ve klinik sunumu genellikle erkekler ve kadınlar arasında farklılık göstermektedir. X'e bağlı bozukluklar ağırlıklı olarak hemizigot erkekleri etkilerken, kadın taşıyıcılar genellikle etkilenmez (30). X'e bağlı bozukluklarda heterozigot dişilerin korunması koruyucu X inaktivasyonunu içerebilir. Ancak USP9X, X inaktivasyonundan kaçan atipik bir X kromozom genidir, yani hem aktif hem de inaktif kromozomlardan ifade edilir. Kaçış derecesinin genler, dokular ve bireyler arasında değiştiği ve muhtemelen fenotipik heterojenliğe katkıda bulunduğu bildirilmektedir (26,30). X kromozomu inaktivasyonundan kaçan USP9X gibi genler için nörogelişimsel bozukluk fenotipi erkeklerde ölümcül olabilir (31). Çalışmamızdaki USP9X ölçümünün periferik kan seviyelerine dayanması, X kromozomu inaktivasyonundan kaçan genler için serum seviyelerinin beyin seviyeleri ile korelasyon gösteremeyeceğini ve serum seviyelerinin X kromozomu inaktivasyonundan kaçan genler için yararlı bir belirteç olmadığını düşündürmektedir.

Hastadan türetilmiş hücre dizilerinin kullanıldığı bir çalışmada, veriler USP9X varyantlarının erkek deneklerde belirgin bir nörogelişimsel ve davranışsal sendromda rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışma, TGF-β sinyalizasyonunun ve hipokampal fonksiyonun kaybının patolojiye önemli katkıda bulunduğuna işaret etmektedir (14).

USP9X missense varyantlarında TGF-β sinyali kaybolmaktadır. Nörogelişimsel sinyal yollarında bu durum substrat seviyelerinde azalmayla sonuçlanır. USP9X missense mutasyonu TGF-β aracılı aksonogenezi inhibe ederken, mTOR aracılı nöral kök hücre proliferasyonunun azalmasına ve WNT aracılı nöral proliferasyon ve farklılaşma ile notch sinyalinin bozulmasına neden olur. Aksonogenez TGF-β tarafından inhibe edilir ve korpus kallozum agenezisi, genişlemiş

ventriküller ve çeşitli beyin anormallikleri ile sonuçlanır. Bu durum hipotoni, motor defektler ve görsel defektlerin yanı sıra kavrama gücünde, vücut tonusunda, yürüyüşte ve görsel pozisyonda azalma ile sonuçlanır (14).

Nörogelişimsel bozukluklarda USP9X substratlarının kaybı ve TGF-β sinyalizasyonunun birleşik defekti göz önüne alındığında, çalışmamızda hem USP9X hem de TGF-β seviyeleri ölçülmüştür. Birçok çalışma, otizmlili çocukların serum ve beyin omurilik sıvısında TGF-β1 düzeylerinin azaldığını göstermiştir. Kyoko ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, düşük TGF-β düzeyleri ile otizm arasında bir bağlantı olabileceği öne sürülmüştür (32). Otizmlili 44 çocuk ile 45 sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, azalmış TGF-β ve IL-10 üretimi otizm ile ilişkilendirilmiştir (33). Benzer örneklem büyüklüğüne sahip bir başka çalışmada, TGF-β1 kodon 25 ile OSB arasında bir ilişki bulunmuştur (34). Vargas ve ark. otizmlili çocuklarda TGF-β2 düzeylerinin arttığını bildirmiştir (35). Mısır'da yapılan bir çalışmanın bulgularına göre, otizm semptomlarının şiddeti ile TGF-β seviyeleri arasında bir bağlantı olabileceği bildirilmiştir. TGF-β seviyeleri azaldıkça stereotipi, sinirlilik ve hiperaktivite gibi davranışsal semptomların kötüleştiğini bildirmişlerdir (36). Başka bir çalışmada, OSB'li çocuklarda daha düşük TGF-β ile daha fazla şiddet içeren davranış skorları arasında bir korelasyon bulunmuştur. Ayrıca, TGF-β1 konsantrasyonu ile otizm şiddeti arasında pozitif bir korelasyon ve TGF-β2 ile otizm şiddeti arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur (37).

TGF-β'nin en az üç izoformu olduğu bilinmektedir (TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3). TGF-β1'in merkezi sinir sisteminin gelişiminde önemli bir düzenleyici rolü olduğu ve çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarında nörogenez için potansiyel etkileri olduğu öne sürülmüştür (37). Bazı araştırmacılar ayrıca TGF-β1'in erken merkezi sinir sistemi gelişiminde baskılayıcı bir rol oynadığını ve nöronal göç, hayatta kalma ve sinaps oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu bulmuşlardır (38).

Çalışmamızda, vaka ve kontrol grupları arasında TGF-β düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmamasına rağmen, vaka grubunun TGF-β düzeyi daha düşük bulunmuştur. Otizm grubundaki düşük TGF-β düzeyleri literatürü desteklemektedir. Çalışmamızda TGF-β alt tiplerinin ayrı ayrı ölçülmemiş olması bulgularımızı sınırlandırmış olabilir. Ayrıca serum TGF düzeylerinin beyindeki TGF düzeylerini yansıtmadığı da belirsizliğini korumaktadır. (39). İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması, tedavinin iyileştirici etkisinin bir sonucu da olabilir. Çünkü tedavinin sitokin düzeyleri ve semptom şiddeti üzerinde olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir (40,41). İlaç kullanmayan 55 ilk epizot psikoz hastası ve 57 sağlıklı kontrolün dâhil edildiği bir çalışmada risperidonun ilk epizot psikoz hastalarında başlangıçta anormal olan sitokin profillerini önemli ölçüde normalleştirdiği kaydedilmiştir (40). Antidepresan ilaçlar ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, antidepresanların antioksidan savunmayı güçlendirerek oksidatif stresi azalttığını göstermiştir (41). Risperidon, proenflamatuvar sitokin inhibitörü ve immünomodülatör bir ilaç olan pentoksifilin ile birlikte kullanıldığında sinirlilik, hiperaktivite, stereotipik davranış ve yanlış konuşmanın düzeldiği bulunmuştur (42). Ayrıca, nonsteroid antienflamatuvar ilaç selekoksib ile kombine edildiğinde, risperidonun otizmin sinirlilik ve stereotipi alt ölçeklerinde önemli gerilemeler sağladığı gösterilmiştir (43).

Çalışmamızda, USP9X ve TGF-β seviyelerinin göz teması alt ölçeği ile korele olduğunu bulduk. Kısıtlı göz teması OSB'nin kırmızı bayrak işaretlerinden biridir ve orta dereceli vakalarda bile göz temasının tehlikeye girebileceği iyi bilinmektedir. Çalışmamızda USP9X ile OSB şiddeti arasında herhangi bir bağlantı bulamamış olsak da, USP9X ile göz teması arasındaki pozitif korelasyon USP9X ile otizm arasında potansiyel bir bağlantı olasılığını akla getirmektedir. Böyle bir bağlantının var olup olmadığını anlamak

için, USP9X ve Otizm spektrum bozukluğu arasındaki ilişkinin daha büyük bir örnekleme ve daha kapsamlı bir şekilde tasarlanmış bir çalışmada incelenmesi gerekmektedir.

Son olarak, çalışmamızın dikkate alınması gereken bazı kısıtlamaları olduğunu belirtmek isteriz. Bunlar arasında çalışmanın kesitsel doğası, küçük örneklem büyüklüğü, hasta grubunda biyobelirteç düzeylerini etkileyebilecek psikotrop ilaçların kullanılması ve biyolojik parametrelerin periferik kandan ölçülmesi yer almaktadır. Otizme neden olan karmaşık süreçlerin anlaşılmasında potansiyel bir oyuncu olarak vurgulanan USP9X düzeylerini ölçen ilk çalışma olması, genetik veya kronik tıbbi hastalıkların dışlanması ve CARS ölçeğinin aynı klinisyen tarafından uygulanması bu çalışmanın güçlü yönleridir. Ayrıca, yaş ve cinsiyet gibi demografik özelliklerin çalışma sonuçları üzerindeki potansiyel karıştırıcı etkilerini azaltmak için sıkı bir eşleştirme prosedürü benimsedik.

Sonuç olarak, USP9X ile otizm arasında bir ilişki olabilir, ancak serumda USP9X seviyelerinin ölçülmesi çalışmanın sonuçlarını sınırlamaktadır. Gelecekte daha geniş bir popülasyonda ve aynı yolaktaki farklı biyobelirteçlerin kombinasyonlarını içeren çalışmalar, OSB'nin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve olası tedavilere yol gösterecektir.

Teşekkür: Yazarlar çalışmaya katılan tüm katılımcılara teşekkür eder.

Etik Komite Onayı: Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Tıbbi Etik Kurulu'ndan 12.01.2022 tarihinde 2021/347 karar numarası ile onay alınmıştır.

Hasta Onamı: Araştırmaya katılan tüm katılımcıların ebeveynlerine bilgilendirilmiş onam verildi ve bilgilendirilmiş onam formları tüm katılımcıların ebeveynleri tarafından imzalandı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağlımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- MK; Tasarım- FST, ZH; Denetleme- MK; Kaynaklar- MK, FST, ZÇ, ZH, ST; Malzemeler- ZÇ, ST; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- ZÇ, ZH; Analiz ve/veya Yorum- ZÇ, ST; Literatür Taraması- FST, ZH; Yazıyı Yazan- FST, ZH; Eleştirel İnceleme- ZMK, ST.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu makale finanse edilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed. 2013;21:591-643. [Crossref]
2. Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, Amoakohene E, Bakian AV, Bilder DA, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years -autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2020. MMWR Surveill Summ. 2023;72(2):1. [Crossref]
3. Ma DQ, Rabionet R, Konidari I, Jaworski J, Cukier HN, Wright HH, et al. Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010;153(2):477-483. [Crossref]
4. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. Nature. 2009;459(7246):569-573. [Crossref]
5. Yoon S, Parnell E, Kasherman M, Forrest MP, Myczek K, Premaratne S, et al. Usp9X controls ankyrin-repeat domain protein homeostasis during dendritic spine development. Neuron. 2020;105(3):506-521.e507. [Crossref]
6. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67(1):425-479. [Crossref]
7. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. Annu Rev Cell Dev Biol. 2006;22:159-180. [Crossref]
8. Antao AM, Tyagi A, Kim K-S, Ramakrishna S. Advances in deubiquitinating enzyme inhibition and applications in cancer therapeutics. Cancers. 2020;12(6):1579. [Crossref]
9. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. Cell. 2005;123(5):773-786. [Crossref]

10. Stegeman S, Jolly LA, Premarathne S, Gecz J, Richards LJ, Mackay-Sim A, et al. Loss of Usp9x disrupts cortical architecture, hippocampal development and TGFβ-mediated axonogenesis. *PLoS One*. 2013;8(7):e68287. [\[Crossref\]](#)
11. Wood SA, Pascoe WS, Ru K, Yamada T, Hirchenhain J, Kemler R, et al. Cloning and expression analysis of a novel mouse gene with sequence similarity to the *Drosophila fat facets* gene. *Mech Dev*. 1997;63(1):29–38. [\[Crossref\]](#)
12. Chen H, Polo S, Di Fiore PP, De Camilli PV. Rapid Ca²⁺-dependent decrease of protein ubiquitination at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):14908–14913. [\[Crossref\]](#)
13. Xu J, Taya S, Kaibuchi K, Arnold AP. Spatially and temporally specific expression in mouse hippocampus of Usp9x, a ubiquitin-specific protease involved in synaptic development. *J Neurosci Res*. 2005;80(1):47–55. [\[Crossref\]](#)
14. Johnson BV, Kumar R, Oishi S, Alexander S, Kasherman M, Vega MS, et al. Partial loss of USP9X function leads to a male neurodevelopmental and behavioral disorder converging on transforming growth factor β signaling. *Biol Psychiatry*. 2020;87(2):100–112. [\[Crossref\]](#)
15. Borovcanin M, Jovanovic I, Dejanovic SD, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. Possible role of TGF-β pathways in schizophrenia [Mogua Uloga TTGF-β Signalnih Puteva U Shizofreniji]. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;17(1):3–8. [\[Crossref\]](#)
16. Yoon S, Parnell E, Penzes P. TGF-β-induced phosphorylation of Usp9X stabilizes ankyrin-G and regulates dendritic spine development and maintenance. *Cell Rep*. 2020;31(8):107685. [\[Crossref\]](#)
17. Yoon S, Piguel NH, Penzes P. Roles and mechanisms of ankyrin-G in neuropsychiatric disorders. *Exp Mol Med*. 2022;54(7):867–877. [\[Crossref\]](#)
18. Schopler E, Reichler RJ, Renner BR. *The childhood autism rating scale (CARS)*. New York: Irvington; 1986.
19. İncekaş Gassaloğlu S, Baykara B, Avci S, Demiral Y. Validity and reliability analysis of Turkish version of childhood autism rating scale. *Türk Psikiyatri Derg*. 2016;27(4):266–274. [\[Crossref\]](#)
20. Gilliam JE. *Gilliam Autism Rating Scale (GARS-2)*, 2nd ed. Austin, TX: Pro-Ed; 2006.
21. Diken IH, Ardiç A, Diken Ö, Gilliam JE. Exploring the validity and reliability of Turkish version of Gilliam Autism Rating Scale-2: Turkish standardization study. *TED Eğitim ve Bilim*. 2012;37(166):318–328.
22. Homan CC, Kumar R, Nguyen LS, Haan E, Raymond FL, Abidi F, et al. Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am J Hum Genet*. 2014;94(3):470–478. [\[Crossref\]](#)
23. Kasherman MA, Currey L, Kurniawan ND, Zalucki O, Vega MS, Jolly LA, et al. Abnormal behavior and cortical connectivity deficits in mice lacking Usp9x. *Cereb Cortex*. 2021;31(3):1763–1775. [\[Crossref\]](#)
24. Oishi S, Premarathne S, Harvey TJ, Iyer S, Dixon C, Alexander S, et al. Usp9x-deficiency disrupts the morphological development of the postnatal hippocampal dentate gyrus. *Sci Rep*. 2016;6(1):25783. [\[Crossref\]](#)
25. Banker SM, Gu X, Schiller D, Foss-Feig JH. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends Neurosci*. 2021;44(10):793–807. [\[Crossref\]](#)
26. Reijnders MR, Zachariadis V, Latour B, Jolly L, Mancini GM, Pfundt R, et al. De novo loss-of-function mutations in USP9X cause a female-specific recognizable syndrome with developmental delay and congenital malformations. *Am J Hum Genet*. 2016;98(2):373–381. [\[Crossref\]](#)
27. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet*. 2009;41(5):535–543. [\[Crossref\]](#)
28. De Laurentiis A, Ciaccio C, Erbetta A, Pinelli M, Nigro V, Pantaleoni C, et al. Periventricular heterotopia in a male child with USP9X missense variant. *Am J Med Genet A*. 2023;191(5):1350–1354. [\[Crossref\]](#)
29. Al-Mubarak B, Abouelhoda M, Omar A, AlDhalaan H, Aldosari M, Nester M, et al. Whole exome sequencing reveals inherited and de novo variants in autism spectrum disorder: a trio study from Saudi families. *Sci Rep*. 2017;7(1):5679. [\[Crossref\]](#)
30. Jolly LA, Parnell E, Gardner AE, Corbett MA, Pérez-Jurado LA, Shaw M, et al. Missense variant contribution to USP9X-female syndrome. *NPJ Genom Med*. 2020;5(1):53. [\[Crossref\]](#)
31. Brand BA, Blesson AE, Smith-Hicks CL. The impact of X-chromosome inactivation on phenotypic expression of X-linked neurodevelopmental disorders. *Brain Sci*. 2021;11(7):904. [\[Crossref\]](#)
32. Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, et al. Decreased serum levels of transforming growth factor-β1 in patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(1):187–190. [\[Crossref\]](#)
33. Moaaz M, Yousry S, Elfatry A, Abd El Rahman M. Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF-β) in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol*. 2019;337:577071. [\[Crossref\]](#)
34. Smail SW, Qadir MK, Rajab MF, Ismail II, Taha OS, Shekha MS, et al. TGF-β1 polymorphism is an inflammatory disease specifier in autism spectrum disorders? *Gene Rep*. 2020;21:100843. [\[Crossref\]](#)
35. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005;57(1):67–81. [\[Crossref\]](#)
36. Hashim H, Abdelrahman H, Mohammed D, Karam R. Association between plasma levels of transforming growth factor-β1, IL-23 and IL-17 and the severity of autism in Egyptian children. *Res Autism Spectr Disord*. 2013;7(1):199–204. [\[Crossref\]](#)
37. Yousefi J, Khakzad MR, Hojati M, Ebrahimi SA, Hosseinpour M, Akhondian J. Is serum TGF-β1 and TGF-β2 levels correlated to children with autism intensity? *Iran J Child Neurol*. 2021;15(2):57–67. [\[Crossref\]](#)
38. Fuentes-Medel Y, Ashley J, Barria R, Maloney R, Freeman M, Budnik V. Integration of a retrograde signal during synapse formation by glia-secreted TGF-β ligand. *Curr Biol*. 2012;22(19):1831–1838. [\[Crossref\]](#)
39. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflamm*. 2012;9:265. [\[Crossref\]](#)
40. Noto C, Ota VK, Gouvea ES, Rizzo LB, Spindola LM, Honda PH, et al. Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(4):pyu042. [\[Crossref\]](#)
41. Lee S-Y, Lee S-J, Han C, Patkar AA, Masand PS, Pae C-U. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;46:224–235. [\[Crossref\]](#)
42. Akhondzadeh S, Fallah J, Mohammadi M-R, Imani R, Mohammadi M, Salehi B, et al. Double-blind placebo-controlled trial of pentoxifylline added to risperidone: effects on aberrant behavior in children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(1):32–36. [\[Crossref\]](#)
43. Asadabadi M, Mohammadi M-R, Ghanizadeh A, Modabbarnia A, Ashrafi M, Hassanzadeh E, et al. Celecoxib as adjunctive treatment to risperidone in children with autistic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology*. 2013;225(1):51–59. [\[Crossref\]](#)