

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**VALPROİK ASİTLE İNDÜKLENEN SIÇAN OTİZM SPEKTRUM
BOZUKLUĞU MODELİNDE DİMETİL FUMARAT UYGULAMASININ
OLASI TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kübra KARADAĞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2024

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**VALPROİK ASİTLE İNDÜKLENEN SIÇAN OTİZM SPEKTRUM
BOZUKLUĞU MODELİNDE DİMETİL FUMARAT UYGULAMASININ
OLASI TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kübra KARADAĞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Ahmet Mert ERTUNÇ

Prof. Dr. Mehmet Yıldırım SARA

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Tıbbi Farmakoloji asistanlığına başladığım günden beri "laf değil söz" söyleyen; her fırsatta gerçeğin değerini ve esas önemli olanı hatırlatan; bilim, felsefe ve sanat sohbetleriyle ufkumu açan Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Mert Ertunç'a,

Bilimde rasyonel olmayı öğreten, ilham verici sorularıyla ufkumu açan Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet Yıldırım Sara'ya,

Heyecanıma ve merakıma değer verip nörofarmakoloji alanında çalışmamın yolunu açan ve "üniversal" değerlerden ayrılmamanın gerekliliğini öğreten Sayın Hocam Prof. Dr. Alper Bektaş İskit'e,

Öğrencilerini sadece mesleğe değil hayata hazırlayan, bilim insanı ve öğretim üyesi duruşuyla örnek aldığım Sayın Hocam Prof. Dr. Melih Önder Babaoğlu'na,

Akademik bilgi birikimini ve her daim pozitif enerjisini bizlerden esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Güray Soydan'a,

Tez çalışmamı hızlı destek projesi olarak onaylayan ve destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Asistanlığımın ilk gününden beri zorluklara beraber göğüs gerdiğim, tez çalışmamdaki birçok deney düzeneğini birlikte kurduğum, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen Dr. Volkan Tümer'e,

Tez projesinin yazımı ve deneyler süresince desteğini esirgemeyen ve tüm sorularıma içtenlikle cevap veren Dr. Barışcan Çimen'e,

Asistanlığım süresince tanıdığım her birinden çok şey öğrendiğim tüm Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji asistanları ve doktora öğrencilerine,

Her ihtiyacım olduğunda sıcak çay desteği ve yardımlarıyla işimi kolaylaştıran Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji personellerine,

Her zaman desteğini hissettiğim, en yakın dostum ve meslektaşım Dr. Aylin Toplu'ya,

Birlikte hayatı ve kendimi tanıyıp yeniden sevdiğim yol arkadaşım Kenan'a ve

En kıymetlilerim; annem Fatma Karadağ, babam Mahmut Karadağ, kardeşlerim Furkan ve Kerem Karadağ'a teşekkür ederim.

ÖZET

Karadağ K., Valproik Asitle İndüklenen Sıçan Otizm Spektrum Bozukluğu Modelinde Dimetil Fumarat Uygulamasının Olası Terapötik Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024. Otizm spektrum bozukluğu (OSB); sosyal etkileşim bozukluğu, sınırlı ilgi alanı, tekrarlayıcı davranışlar ve duyuşsal anomalilerle karakterize kompleks bir nörogelişimsel bozukluktur. Etiyopatogenezi tam olarak bilinmemektedir ve temel semptomları üzerinde etkili bir medikal tedavi yoktur. OSB'li bireylerde ve deneysel OSB modellerinde yapılan araştırmalarda OSB etiyopatogenezinde oksidatif stres ve nöroinflamasyonun rolüne dair bulgular artmaktadır. Oksidatif strese karşı sitoprotektif ve inflamatuvar yanıtta regülatör etkili Nrf2 (*Nuclear erythroid-related 2 factor 2*) yolağı aktivitesinin OSB'de azaldığına dair bulgular vardır. Dimetil fumarat (DMF), etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte multipl skleroz ve psöriazis tedavisinde kullanılan antioksidan ve immunomodülatör etkili bir Nrf2 aktivatörüdür. Çalışmamızda, sıçanlarda prenatal dönemde valproik asit (VPA) maruziyeti ile oluşturulan OSB modelinde, DMF'in OSB semptomları üzerine tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlandı. VPA ile indüklenen OSB modelinde; infant dönemde fiziksel, sensorimotor gelişim ve sosyal bağlanma değerlendirildi. Adölesan dönemde oral gavaj ile DMF uygulamasına başlandı. DMF'in tedavi edici etkileri; tekrarlayıcı davranışların, sosyal etkileşimin, kompulsif benzeri davranışların, anksiyetenin ve lokomotor aktivitenin değerlendirildiği davranış deneyleri ve serebellum ve prefrontal korteks (PFC) dokularında oksidatif stres ve nöroinflamasyon ilişkili belirteçlerin kolorimetrik testler ve ELISA metodu ile ölçülmesiyle davranışsal ve moleküler düzeyde incelendi. Prenatal VPA maruziyeti, her iki cinsiyette sosyal bağlanmayı bozdu ve dişi yavrularda sensorimotor becerilerde geriliğe neden oldu. Dimetil fumarat, OSB modelinde serebellum ve PFC'de nöroinflamatuvar belirteçleri değıştirmezken, azalan antioksidan yanıtı güçlendirdi ve sosyal etkileşim bozukluğunu giderdi.

Anahtar Kelimeler: Otizm, valproik asit, dimetil fumarat, oksidatif stres, nöroinflamasyon.

Çalışmamız, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen THD-2022-19851 kodlu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

ABSTRACT

Karadağ K., Investigation of the Possible Therapeutic Effects of Dimethyl Fumarate Administration in the Valproic Acid-Induced Rat Autism Spectrum Disorder Model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Ankara, 2024. Autism spectrum disorder (ASD); is a complex neurodevelopmental disorder characterized by social interaction deficit, limited interests, repetitive behaviors and sensory abnormalities. The etiopathogenesis of ASD is not fully known and there is no effective medical treatment for the core symptoms of ASD. In studies conducted in individuals with ASD and experimental ASD models, evidence on the role of oxidative stress and neuroinflammation in the etiopathogenesis of ASD are increasing. There are results that the activity of the Nrf2 (Nuclear erythroid-related 2 factor 2) pathway, which has a regulatory effect on the inflammatory response and cytoprotective to oxidative stress, is reduced in ASD. Dimethyl fumarate (DMF) is an clinically used Nrf2 activator with antioxidant and immunomodulatory effects used in the treatment of multiple sclerosis and psoriasis, although its mechanism of action is not fully known. In our study, we aimed to investigate the therapeutic effects of DMF on ASD symptoms in the ASD model induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA) in rats. In the VPA-induced ASD model; physical development, sensorimotor development and social attachment were evaluated in the infancy period. DMF administration with oral gavage was started in the adolescence period. Therapeutic effects of DMF; were examined at behavioral and molecular levels by behavioral experiments evaluating repetitive behaviors, social interaction, compulsive-like behaviors, anxiety and locomotor activity. By using colorimetric tests and ELISA method oxidative stress and neuroinflammation-related markers were evaluated in cerebellum and prefrontal cortex (PFC). Prenatal VPA exposure impaired social attachment in both sexes and caused impairment in sensorimotor skills in female offspring. While dimethyl fumarate did not alter neuroinflammatory markers in the cerebellum and PFC in the ASD model, it augmented the decreased antioxidant response and rescued the social interaction deficit. **Keywords:** Autism, valproic acid, dimethyl fumarate, oxidative stress, neuroinflammation. Our study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with the project code THD-2022-19851.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| TEŞEKKÜR | III |
| ÖZET | IV |
| ABSTRACT | V |
| İÇİNDEKİLER | VI |
| SİMGE VE KISALTMALAR | XII |
| ŞEKİL DİZİNİ | XVII |
| TABLO DİZİNİ | XX |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. OSB Epidemiyolojisi | 3 |
| 2.2. Komorbiditeler, Sendromik (Sekonder) ve Non-sendromik (Primer, idiyopatik) OSB | 3 |
| 2.3. Risk Faktörleri | 4 |
| 2.3.1. Genetik Risk Faktörleri | 4 |
| 2.3.2. Çevresel Risk Faktörleri | 6 |
| 2.4. Mevcut Tedaviler | 7 |
| 2.5. OSB Etiyopatogenezi ile İlgili Teoriler | 8 |
| 2.5.1. Oksidatif Stres | 8 |
| 2.5.2. Bozulmuş İmmunite ve Nöroinflamasyon | 9 |
| 2.5.3. Nöral Bağlantılar | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.4. Bozulmuş Nöral Migrasyon | 11 |
| 2.5.5. Eksitasyon/İnhibisyon (E/İ) Dengesizliği | 11 |
| 2.5.6. Zihin Teorisi | 12 |
| 2.5.7. Kırık Ayna Teorisi | 12 |
| 2.6. Deneysel OSB Modelleri | 13 |
| 2.6.1. Valproik asit ve Valproik Asitle İndüklenen OSB Modeli | 14 |
| 2.7. Dimetil Fumarat | 16 |
| 2.8. Nrf2 Yolağı | 19 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 21 |
| 3.1. Deney Hayvanları | 21 |
| 3.2. İlaçlar | 21 |
| 3.3. Deney Hayvanlarında Gebeliğin Tespiti | 21 |
| 3.4. VPA ile İndüklenen OSB Modeli Oluşturulması | 22 |
| 3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması | 22 |
| 3.6. Gelişimsel Takip Testleri | 24 |
| 3.6.1. Vücut Ağırlığı Ölçümü | 24 |
| 3.6.2. Boy Uzunluğu Ölçümü | 24 |
| 3.6.3. Göz Açılma Gününün Belirlenmesi | 24 |
| 3.6.4. Palmar Kavrama Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi | 24 |
| 3.6.5. Doğrulma Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.6.6. Doğrulma Testi | 26 |
| 3.6.7. Uçurumdan Kaçınma Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi | 26 |
| 3.6.8. Yürüme Testini Tamamlayabilme Gününün Belirlenmesi | 27 |
| 3.6.9. Yürüme Testi | 27 |
| 3.6.10. Negatif Geotaksi Testi | 27 |
| 3.6.11. Akustik İrkilme Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi | 28 |
| 3.6.12. Anne Kokusu Tercih Testi | 28 |
| 3.7. Oral Gavaj Uygulamaları | 30 |
| 3.8. Davranış Deneyleri Planı | 31 |
| 3.9. Davranış Deneyleri | 31 |
| 3.9.1. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi | 31 |
| 3.9.2. Grooming Testi | 32 |
| 3.9.3. Misket Gömme Testi | 33 |
| 3.9.4. Yükseltilmiş Artı Testi | 34 |
| 3.9.5. Açık Alan Testi | 35 |
| 3.10. Prefrontal Korteks ve Serebellar Vermis Dokularının İzolasyonu | 35 |
| 3.11. Doku Homojenatlarından Tüm Hücre Protein Ekstraksiyonlarının Yapılması ve Örneklerin Saklanması | 36 |
| 3.12. Total Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi | 36 |
| 3.13. Oksidatif Stres İlişkili Belirteçlerin Ölçümü | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.13.1. TOS Ölçümü | 36 |
| 3.13.2. TAS Ölçümü | 36 |
| 3.14. Nöroinflamasyon İlişkili Belirteçlerin Ölçümü | 37 |
| 3.14.1. TNF α ELISA | 37 |
| 3.14.2. İL-6 ELISA | 37 |
| 3.14.3. MCP1/CCL2 ELISA | 37 |
| 3.14.4. TGF β ₁ ELISA | 38 |
| 3.14.5. GFAP ELISA | 38 |
| 3.15. İstatistiksel Analiz | 39 |
| 4. BULGULAR | 40 |
| 4.1. Gelişimsel Takip Testleri Bulguları | 40 |
| 4.1.1. Vücut Ağırlığı Ölçümlerinin Karşılaştırılması | 40 |
| 4.1.2. Boy Uzunluğu Ölçümlerinin Karşılaştırılması | 41 |
| 4.1.3. Nörogelişimsel Parametrelerin Değerlendirilmesi | 42 |
| 4.1.4. Doğrulma Testi Bulguları | 43 |
| 4.1.5. Yürüme Testi Bulguları | 44 |
| 4.1.6. Negatif Geotaksi Testi Bulguları | 45 |
| 4.1.7. Anne Kokusu Tercih Testi Bulguları | 46 |
| 4.1.7.1. Anne Kokusu Tercih Testi Erkek Yavruların Bulguları | 49 |
| 4.1.7.2. Anne Kokusu Tercih Testi Dişi Yavruların Bulguları | 51 |

| | |
|--|----|
| 4.1.7.3. Anne Kokusu Tercih Testi Kontrol Grubu Bulgularında Cinsiyetin Etkisi | 53 |
| 4.1.7.4. Anne Kokusu Tercih Testi VPA Grubu Bulgularında Cinsiyetin Etkisi | 55 |
| 4.2. Davranış Deneyleri Bulguları | 57 |
| 4.2.1. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi Bulguları | 57 |
| 4.2.2. Grooming Testi Bulguları | 60 |
| 4.2.3. Misket Gömme Testi Bulguları | 61 |
| 4.2.4. Yükseltilmiş Artı Testi Bulguları | 62 |
| 4.2.5. Açık Alan Testi Bulguları | 63 |
| 4.3. Serebellum ve PFC Dokularında TAS, TOS ve OSİ Bulguları | 65 |
| 4.4. Serebellum ve PFC Dokularında ELISA Bulguları | 68 |
| 4.4.1. TNF α ELISA Bulguları | 68 |
| 4.4.2. İL-6 ELISA Bulguları | 69 |
| 4.4.3. MCP1/CCL2 ELISA Bulguları | 70 |
| 4.4.4. TGF β ₁ ELISA Bulguları | 71 |
| 4.4.5. GFAP ELISA Bulguları | 72 |

| | |
|---|----|
| 5. TARTIŞMA | 73 |
| 5.1. Prenatal VPA Maruziyetinin Fiziksel Gelişim ve Sensorimotor Beceriler Üzerine Etkisi | 73 |
| 5.2. Dimetil Fumaratın Sosyal Etkileşim Bozukluğu Üzerine Etkisi ve İlgili Mekanizmalar | 74 |
| 5.3. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde İnfant Dönemde Sosyal Becerilerin Değerlendirilmesi | 76 |
| 5.4. VPA ile İndüklenen OSB Modelinin ve DMF'in Nöroinflamatuvar Belirteçlere Etkisi | 77 |
| 5.5. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Tekrarlayıcı Davranışların Değerlendirilmesi ve Tekrarlayıcı Davranışlarda DMF Etkisi | 79 |
| 5.6. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi ve DMF'in Lokomotor Aktiviteye Etkisi | 80 |
| 5.7. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Komorbidite Değerlendirilmesi ve DMF'in Komorbid Durumlara Etkisi | 80 |
| 6. ÇALIŞMAMIZIN KISITLILIKLARI | 81 |
| 7. SONUÇ ve ÖNERİLER | 82 |
| 8. KAYNAKLAR | 84 |

SİMGE ve KISALTMALAR

| | |
|----------------------------|--|
| 2-ene-VPA | 2-propil-2-pentenoik asit |
| 4-ene-VPA | 2-propil-4-pentenoik asit |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| ACC | Anterior singulat korteks |
| ADNP | Aktivite bağımlı nöroprotektif protein (<i>Activity-dependent neuroprotective protein</i>) |
| AKT | Serin/threonine protein kinaz |
| ANK2 | Ankrin 2 |
| ANOVA | Varyans analizi |
| ARE | Antioksidan yanıt elemanı (<i>Antioxidant response element</i>) |
| ARID1B | AT'den zengin etkileşim domaini 1B (<i>AT-Rich interaction domain 1B</i>) |
| BA | Brodmann alanı |
| BCL11A | B hücreli lenfoma/lösemi transkripsiyon faktörü 11A |
| BOS | Beyin omurilik sıvısı |
| CMC | Karboksimetilselüloz |
| CHD8 | Kromodomain helikaz domain 8 |
| CNTNAP2 | Kontaktin ilişkili protein benzeri 2 (<i>Contactin-associated protein-like 2</i>) |
| CNV | Kopya sayısı varyasyonu |
| Cul3 | <i>Cullin3</i> |
| DM | Diabetes mellitus |
| DMF | Dimetil fumarat |

| | |
|-----------------|---|
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DYRK1A | Çift özgülüklü tirozin-(Y)-fosforilasyonla düzenlenen kinaz 1a (<i>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1a</i>) |
| ELISA | Enzim bağlı immunosorbent tetkik (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| EMA | Avrupa İlaç Ajansı (<i>European Medicines Agency</i>) |
| E/İ | Eksitasyon/İnhibisyon |
| FDA | Gıda ve İlaç İdaresi (<i>Food and Drug Administration</i>) |
| FMR1 | Frajil X mesajcı ribonükleoprotein 1 |
| fMRI | Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme |
| GA | Güven aralığı |
| GAD | Glutamik asit dekarboksilaz |
| GABA | Gama amino bütirik asit |
| GFAP | Glial fibriler asidik protein (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>) |
| GRIN2B | NMDA glutamat iyonotropik reseptörü 2B altbirimi (<i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B</i>) |
| GSH | Glutasyon |
| GSK3β | Glikojen sentaz kinaz 3β |
| GSSG | Glutasyon disülfid |
| HCAR2 | Hidrokarboksilik asit reseptörü 2 |
| HDAC | Histon deasetiaz |
| HIST1H1E | Histon gen kümesi 1E üyesi (<i>Histone Gene Cluster 1 Member E</i>) |
| HO1 | Hemoksijenaz 1 |
| Hz | Hertz |
| İL | İnterlökin |

| | |
|----------------|---|
| KATNAL2 | Katanin katalitik A1 benzeri 2 altbirimi (<i>Katanin catalytic subunit A1 like 2</i>) |
| KDM5C | Lizin demetilaz 5C |
| KEAP1 | Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>) |
| LD | Letal doz |
| LPS | Lipopolisakkarid |
| MDA | Malonildialdehit |
| MMF | Monometil fumarat |
| mPFC | Medial prefrontal korteks |
| mRNA | Mesajcı ribonükleik asit |
| MecP2 | Metil-CPG bağlı protein 2 (<i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>) |
| MCP1 | Monosit kemoatraktant protein 1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>) |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| NfκB | Nükleer faktör kappa B |
| Nrf2 | Nükleer eritroid 2 bağlı 2 faktör 2 (<i>Nuclear erythroid-related 2 factor 2</i>) |
| NRXN1 | Nöreksin 1 |
| NQO1 | NAD(P)H dehidrojenaz |
| OD | Otozomal dominant |
| OSB | Otizm spektrum bozukluğu |
| OSİ | Oksidatif stres indeksi |
| OXTR | Oksitosin reseptörü |
| PFC | Prefrontal korteks |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3 kinaz |

| | |
|--|--|
| POGZ | ZNF domaininden türetilmiş Pogo transpoze edebilir eleman (<i>Pogo transposable element derived with ZNF domain</i>) |
| Poly I:C | Poli-inosinik poli-sitidilik asit |
| PV | Parvalbumin |
| RANTES | <i>Regulated on activation, normal T expressed and secreted</i> |
| RELN | Reelin |
| RNA | Ribonükleik asit |
| RRMS | Relaps ve remisyonla seyreden multipl skleroz |
| s | Saniye |
| SC | Subkutan |
| SCN2A | Voltaj kapılı sodyum kanalı $\alpha 2$ altbirimi |
| SD | Sprague Dawley türü sıçan |
| SHANK3 | SH3 ve çoklu ankrin domainleri tekrarları 3 (<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3</i>) |
| SNV | Tek nükleotid varyasyonu |
| SOD | Süperoksid dismutaz |
| SSRI | Selektif serotonin geri alım inhibitörü (<i>Selective serotonin reuptake inhibitory</i>) |
| SYNGAP1 | Sinaptik Ras GTPaz aktive edici protein 1 (<i>Synaptic Ras GTPase activating protein 1</i>) |
| TAS | Total antioksidan durum |
| TBC1 | Tuberoskleroz kompleksi-1 |
| TBC2 | Tuberoskleroz kompleksi-2 |
| TBR1 | T-box beyin transkripsiyon faktörü 1 (<i>T-box brain transcription factor 1</i>) |
| TGFβ₁ | Dönüştürücü büyüme faktörü 1 β (<i>Transforming growth factor β₁</i>) |

| | |
|------------------|--|
| Th | Yardımcı T hücresi (<i>T helper</i>) |
| TLR3 | Toll-like reseptör 3 |
| TOS | Total oksidan durum |
| UBE3A | Ubiquitin protein ligaz E3A (<i>Ubiquitin-protein ligase E3A</i>) |
| UGT | UDP-glukuronosiltransferaz |
| VPA | Valproik asit |
| Wnt site) | Wingless ilişkili entegrasyon bölgesi (<i>Wingless-related integration site</i>) |

ŞEKİL DİZİNİ

| Şekil | Sayfa No |
|---|----------|
| Şekil 2.1. Valproik asit ve metabolitlerinin moleküler yapıları | 15 |
| Şekil 2.2. Dimetil fumaratın esteraş yoluyla monometil fumarata metabolizması. | 17 |
| Şekil 2.3. Oksidatif stres koşullarında ve bazal koşullarda Nrf2 yolağının işleyişı. | 20 |
| Şekil 3.1. Vajinal yaymanın ışık mikroskobu incelemesinde sıçan spermelerinin görünümü (40x büyütme). | 22 |
| Şekil 3.2. Deney gruplarının oluşturulması. | 23 |
| Şekil 3.3. Palmar kavrama refleksi kazanılmasının değerlendirilmesi. | 25 |
| Şekil 3.4. Doğrulma refleksi kazanılmasının değerlendirilmesi. | 25 |
| Şekil 3.5. Uçurumdan kaçınma refleksi değerlendirilmesi. | 26 |
| Şekil 3.6. Yürüme testi. | 27 |
| Şekil 3.7. Negatif geotaksi testi. | 28 |
| Şekil 3.8. Anne kokusu tercih testi. | 29 |
| Şekil 3.9. Gelişimsel takip testleri planı. | 30 |
| Şekil 3.10. Üç odacıklı sosyal etkileşim testi. | 32 |
| Şekil 3.11. Grooming testi. | 33 |
| Şekil 3.12. Misket gömme testi. | 34 |
| Şekil 3.13. Yükseltilmiş artı testi. | 34 |

| | |
|--|----|
| Şekil 3.14. Açık alan testi. | 35 |
| Şekil 3.15. Araştırma protokolünün şematik özeti. | 38 |
| Şekil 4.1. Vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. | 40 |
| Şekil 4.2. Boy uzunluklarının karşılaştırılması. | 41 |
| Şekil 4.3. Doğrulma testi sürelerinin karşılaştırılması. | 43 |
| Şekil 4.4. Yürüme testi sürelerinin karşılaştırılması. | 44 |
| Şekil 4.5. Negatif Geotaksi testi sürelerinin karşılaştırılması. | 45 |
| Şekil 4.6. Anne kokusu tercih testinde maternal zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. | 46 |
| Şekil 4.7. Anne kokusu tercih testinde yabancı zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. | 47 |
| Şekil 4.8. Anne kokusu tercih testinde anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. | 48 |
| Şekil 4.9. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 49 |
| Şekil 4.10. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 50 |
| Şekil 4.11. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. | 50 |
| Şekil 4.12. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 51 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.13. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 52 |
| Şekil 4.14. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. | 52 |
| Şekil 4.15. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 53 |
| Şekil 4.16. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 54 |
| Şekil 4.17. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. | 54 |
| Şekil 4.18. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 55 |
| Şekil 4.19. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. | 56 |
| Şekil 4.20. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. | 56 |
| Şekil 4.21. Üç odacıklı sosyal etkileşim testinde sosyal ve sosyal olmayan zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. | 58 |
| Şekil 4.22. Üç odacıklı sosyal etkileşim testinde sosyallik indekslerinin karşılaştırılması. | 59 |
| Şekil 4.23. Kümülatif grooming sürelerinin karşılaştırılması. | 60 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.24. Misket gömme testinde toplam gömülü misket sayılarının karşılaştırılması. | 61 |
| Şekil 4.25. Yükseltilmiş artı testinde açık kolda geçirilen toplam sürelerin karşılaştırılması. | 62 |
| Şekil 4.26. Açık alan testinde toplam katedilen mesafelerin karşılaştırılması. | 63 |
| Şekil 4.27. Açık alan testinde merkezde geçirilen sürelerin karşılaştırılması. | 64 |
| Şekil 4.28. Serebellum ve PFC'de total oksidan status (TOS) ve total antioksidan status (TAS) ölçümlerinin karşılaştırılması. | 66 |
| Şekil 4.29. Serebellum ve PFC'de oksidatif stres indekslerinin (OSİ) karşılaştırılması. | 67 |
| Şekil 4.30. Serebellum ve PFC'de TNF α düzeylerinin karşılaştırılması. | 68 |
| Şekil 4.31. Serebellum ve PFC'de İL-6 düzeylerinin karşılaştırılması. | 69 |
| Şekil 4.32. Serebellum ve PFC'de MCP1/CCL2 düzeylerinin karşılaştırılması. | 70 |
| Şekil 4.33. Serebellum ve PFC'de TGF β ₁ düzeylerinin karşılaştırılması. | 71 |
| Şekil 4.34. Serebellum ve PFC'de GFAP düzeylerinin karşılaştırılması. | 72 |
| Şekil 5.1. Duyusal girdilerin sosyal bağlamlarda sosyal davranışsal kararlara dönüştürülmesi. | 75 |

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Tablo 4.1. Nörogelişimsel Parametrelerin Karşılaştırılması | 42 |
|---|----|

1. GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB); sosyal etkileşim ve iletişim bozukluğu, sınırlı ilgi alanı, tekrarlayıcı davranışlar ve duyuşsal anomalilerle karakterize kompleks bir nörogelişimsel bozukluktur [1]. İlk defa 1943 yılında psikiyatrist Leo Kanner tarafından tanımlanmıştır [2]. Günümüzde OSB'nin temel semptomları üzerinde etkili medikal bir tedavi olanağı bulunmamaktadır [3].

OSB'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte kompleks, multigenik etkileşimler ve olası çevresel faktörlere dayandığı öne sürülmektedir [4]. OSB patogeneğinde nöroinflamasyon ve oksidatif stresin rolüne dair bulgular gün geçtikçe artmaktadır [5].

Dimetil fumarat (DMF), relaps ve remisyonlarla seyreden multipl skleroz (*relapsing remitting multipl skleroz*, RRMS) ve plak psöriazis tedavisini içeren geniş bir alanda kullanımı onaylanmış immünomodülatör ve antioksidan etkili bir ön ilaçtır [6].

OSB'li bireylerde yapılan çalışmalarda, *Brassicaceae* familyasındaki bitkilerden elde edilen bir izotiyosiyanat olan sülforafanın (SFN), OSB'de sık görülen iritabilite, stereotipik hareket, letarji, hiperaktivite gibi semptomlara karşı kısmi terapötik etkinliği gösterilmiştir [7]. SFN'nin OSB için terapötik etkinliğine dair klinik çalışmalarda devam etmektedir.

DMF; SFN ile benzer olarak, oksidatif strese karşı sitoprotektif ve inflamatuvar yanıtta regülatör etkili olduğu bilinen Nrf2 (*nuclear erythroid-related 2 factor 2*) yolağı üzerinde aktivatör etki göstermektedir [8].

Çalışmamızın amaçları şu şekildedir:

- 1) Prenatal VPA maruziyeti sonucu; infant dönemde, fiziksel ve sensorimotor gelişimde ve sosyal bağlanmadaki değişimleri ve bu değişimlerde cinsiyetin etkisini incelemek,
- 2) VPA ile indüklenen sıçan OSB modelinde; DMF uygulamasının, OSB benzeri davranış fenotipi üzerindeki terapötik etkinliğini ve etki mekanizmalarını araştırmak,
- 3) Genel çerçevede OSB'nin oksidatif stres ve nöroinflamasyon ile ilişkisini incelemek.

Çalışmamızın hipotezleri şu şekildedir:

- 1) Prenatal dönemde VPA maruziyeti sonucu yavrularda OSB benzeri fenotip ve nörogelişimsel parametrelerde gerilik görülmesi, oksidatif stres ve nöroinflamasyon aracılıdır.
- 2) Dimetil fumarat, antioksidan ve immunomodülatör etkileri ile OSB fenotipinde iyileşme sağlar.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OSB Epidemiyolojisi

OSB; tüm ırklarda, etnik gruplarda ve farklı sosyoekonomik düzeylerde görülebilmektedir [9]. Günümüzde dünyada yaklaşık 28 milyon OSB vakası olduğu bilinmektedir. 2019 yılında yapılan 204 ülkeyi kapsayan bir çalışmada OSB insidansı 603.790 vaka olarak belirlenmiş 1990 yılı ile 2019 yılı verileri karşılaştırıldığında prevalansta %39,3; insidansta %0,1 artış olduğu görülmüştür [10]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 2020 yılı verilerine göre 8 yaşındaki her 36 çocuktan 1'inin OSB tanısı aldığı ve erkek çocuklarında OSB görülme oranının kız çocuklarının yaklaşık 4 katı olduğu bildirilmiştir [11]. Ülkemizde ise 2019 yılı Sağlık Bakanlığı verilerinde 38.661 OSB'li birey olduğu raporlanmıştır [12].

2.2. Komorbiditeler, Sendromik (Sekonder) ve Non-sendromik (Primer, idiyopatik) OSB

OSB'li çocuklarda dil becerilerinde ve motor becerilerde gerilik sık görülen durumlardır [13]. OSB'li ergen ve yetişkinlerde; epilepsi, zeka geriliği, obsesif kompulsif bozukluk, duygudurum bozuklukları, uyku bozuklukları, yeme bozuklukları, gastrointestinal problemler ve immun sistem disfonksiyonları genel popülasyona göre fazla oranda görülmektedir [14,15].

OSB'li bireylerde yaklaşık %25 oranında genetik bir neden belirlenebilmektedir. Bunların yaklaşık %5'i tek gen bozuklukları, %10-20'si kopya sayısı varyasyonları (*Copy number variation*, CNV, submikroskopik delesyonlar veya duplikasyonlar) ve yaklaşık %5'i sitogenetik olarak görülebilen kromozom anomalileridir. Bu nedenle OSB, sendromik (sekonder) ve non-sendromik (idiyopatik, primer) OSB şeklinde ayrılmaktadır [16,17]. Bazı sendromik OSB oranlarına bakıldığında: Fajil X sendromlu hastaların %18-33'ünde, Tuberoskleroz tanılı hastaların %25-60'ında, Rett sendromlu kız çocuklarının %80-100'ünde, Angelman sendromlu hastaların %50-81'inde, Prader-Willi sendromlu çocukların %19-36,5'unda, Phelan-McDermid sendromlu bireylerin %50-70'inde OSB bulgularının eşlik ettiği görülmektedir [18,19].

2.3. Risk Faktörleri

2.3.1. Genetik Risk Faktörleri

Avrupa ve ABD'de yapılan ikiz ve aile çalışmaları ile OSB'nin % 50-90 oranında genetik geçişli olduğu sonucuna varılmıştır [20,21] Monozigotik ikizlerdeki OSB konkordans oranı %92 iken dizigotik ikizlerde bu oranın %10'a düşmesi genetik faktörlerin OSB etiopatogenezinde önemini vurgulamaktadır [22]. OSB'li kardeş öyküsü diğer bir çocuğun OSB tanısı alma riskini %3-18 oranında artırmaktadır [23,24].

Son yıllarda genom analiz teknolojilerindeki ilerlemelerle birlikte, OSB ile ilişkili kalıtsal ve *de novo* mutasyonlar, CNV'ler de dahil olmak üzere nadir genetik varyasyonların belirlenmesi yönünde önemli gelişmeler katedilmiştir [25]. Tespit edilebilen spesifik *de novo* ve kalıtsal CNV'ler, non-sendromik (idiyopatik) OSB tanısı olan çocukların küçük bir kısmıyla (yaklaşık %10) sınırlı olsa da etiopatogenezde etkili yolların araştırılması açısından önemlidir. OSB ile güçlü şekilde ilişkisi olduğu gösterilen *de novo* SNV (*Single nucleotide variation*)'lerin olduğu genler arasında: CHD8 (*Chromodomain helicase domain 8*), DYRK1A (*Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1a*), SCN2A (*Sodium voltage-gated channel alpha subunit 2*), ARID1B (*AT-Rich interaction domain 1B*), ANK2 (*Ankyrin 2*), GRIN2B (*Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B*), SYNGAP1 (*Synaptic Ras GTPase activating protein 1*), ADNP (*Activity-Dependent Neuroprotective Protein*), TBR1 (*T-box brain transcription factor 1*), POGZ (*Pogo transposable element derived with ZNF domain*) ve KATNAL2 (*Katanin catalytic subunit A1 like 2*) vardır. Çalışmalarda sıklıkla tespit edilen kopya sayısı varyasyonlarına bakıldığında: NRXN1 (*Neurexin 1*) delesyonu, 16p11.2 delesyonu, 15q11.2q13 duplikasyonu, 16p11.2 duplikasyonu ve 15q13.3 delesyonu öne çıkmaktadır. Sendromik OSB vakaları genom analizlerinde; Frajil X sendromu (X geçişli, FMR1, *Fragile X messenger ribonucleoprotein 1* geni trinükleotid tekrar mutasyonu), tuberoskleroz (OD/ *de novo* TSC1-TSC2 (*Tuberous sclerosis complex-1,2*) genleri çerçeve kaydırma, yanlış anlamlı, anlamsız, insersiyon, delesyon ve yeniden düzenleme mutasyonları), Phelan-McDermid sendromu (OD, *de novo* SHANK3, *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3* geni terminal delesyon, ring kromozom, dengesiz translokasyon, intersitisyel delesyon, çerçeve kaydırma ve anlamsız mutasyonlar) ve nörofibromatozis tip 1 (OD/ *de novo* NF1 geni yanlış anlamlı, anlamsız, insersiyon, delesyon

mutasyonları) önde gelen sendromik OSB nedenleri arasındadır [26,27]. OSB ilişkili *de novo* mutasyonlar sonucu etkilenen genlerle ilgili ortak sinyal yolları incelendiğinde: Kromatin yeniden şekillendirilmesi (*remodeling*), embriyonel gelişim sürecinde Wnt (*Wingless-related integration site*) sinyal yolağı ve sinaptik fonksiyonlar başlıkları öne çıkmıştır [28].

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisini değiştirmeden kromatin yapısını ve gen ekspresyonunu düzenleyen durumlardır [29]. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu, gen ekspresyonunda rol oynayan iki ana moleküler epigenetik mekanizmadır. Kromatin yapısının ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir diğer faktör de kodlamayan (*non-coding*) RNA'dır [30]. OSB'li bireylerde epigenetik ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerle ilgili biriken bulgular OSB fenotipinin ortaya çıkmasında epigenetik modifikasyonların rolüne dikkat çekmektedir [31-33].

MeCP2 (*Methyl-CpG-binding protein 2*), UBE3A (*Ubiquitin-protein ligase E3A*), OXTR (*Oxytocin receptor*) ve SHANK3 genlerinde DNA metilasyonu yoluyla meydana gelen epigenetik değişiklikler OSB ile ilişkili bulunmuştur [34-40].

KDM5C (*Lysine demethylase 5C*), HIST1H1E (*Histone Gene Cluster 1 Member E*), CHD8, ARID1B, BCL11A (*Transcription factor B-cell lymphoma/leukemia 11A*) ve ADNP (*Activity-dependent neuroprotective protein*) genlerinde histon modifikasyonu sonucu meydana gelen kromatin yeniden modellenmesi (*remodeling*) ve transkripsiyon değişikliklerinin de OSB etyolojisinde rolü olduğu öne sürülmüştür [41-46].

Protein sentezini veya mRNA degradasyonunu bloke ederek birçok genin posttranskripsiyonel ekspresyonunu kontrol eden epigenetik düzenleyici mikro RNA'ların (miRNA) sentezindeki düzensizliklerin de OSB etiyopatogenezinde rol oynayabileceği gösterilmiştir [47-50].

2.3.2. Çevresel Risk Faktörleri

Anne ve baba yaşının ileri olması (anne>40 yaş, baba>50 yaş) OSB riskini artırdığı bilinen temel çevresel nedenlerdendir [51].

Doğum ile ilgili komplikasyonlar da OSB için kanıt düzeyi yüksek çevresel risk faktörleri arasındadır. Uzamış doğum eylemi, doğum esnasında bebekte hipoksi veya asfiksi gelişmesi, mekonyum aspirasyonu, erken membran rüptürü, maternal hemorajiler, makat geliş gibi anormal doğum pozisyonları, RH uyumsuzluğu; ilerleyen dönemlerde çocuğun OSB tanısı alma riskini artırmaktadır. Çoğul gebelikler, diğer doğumla arasında 12 aydan kısa bir süre olması, yaz mevsiminde doğum, düşük doğum ağırlığı durumlarında da OSB riskinin arttığı gösterilmiştir [52,53]. Sezaryen ile doğum yapan annelerin çocuklarında OSB daha sık görülmektedir [54].

Anne ile ilgili durumlardan maternal diyabet, obezite, maternal bakteriyel veya viral enfeksiyonların varlığı OSB riskini artırmaktadır [55-57].

Çevre kirliliği de OSB riskini artırdığı bilinen faktörlerdendir. Gebelik süresince maruz kalınan hava kirliliği düzeyi çocukta OSB görülme riskini artırmaktadır [58]. Aynı zamanda prenatal dönemde pestisite maruz kalmanın da OSB riskini belirgin düzeyde artırdığı gösterilmiştir [59].

Ailede otoimmün hastalık öyküsü olması %28 daha yüksek OSB riski oluşturmaktadır. Özellikle hipotiroidizm, Tip1 DM, romatoid artrit ve psöriazis öyküsü olan ailelerde diğer otoimmün hastalıklara göre risk daha fazla bulunmuştur [60].

Popülasyon bazlı bir vaka kontrol çalışmasında; 95.978 çocuk katılımcı üzerinde prenatal dönemde maruz kalınan sinaptik aşırımı etkileyen çeşitli ilaç gruplarının etkisi incelenmiş ve kanabinoid reseptör agonistleri, nöronal nikotinik reseptör α antagonistleri, muskarinik reseptör 2 agonistleri, α_{2C} adrenerjik reseptör agonistleri ve opioid reseptör κ ve ϵ agonistleri olmak üzere 5 ilaç grubunun çocuklarda anlamlı düzeyde OSB riskini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır [61]. Başka bir çalışmada; gebelikte antidepresan kullanımı, çocuklarda artmış OSB riski ile ilişkili bulunmuştur. Fakat bu ilişki annenin ilaç kullanmasına neden olan tanıyla da bağlantılı olabileceğinden ilaçların endikasyonları OSB risk artışının yorumlanması için karıştırıcı faktör olarak değerlendirilmiştir. Nitekim psikiyatrik bir tanısı olmadan gebelikte SSRI

(*Selective serotonin reuptake inhibitor*, selektif serotonin geri alım inhibitörü) kullanan annelerin bebeklerinde OSB riskinde anlamlı artış olmadığı görülmüştür [62,63].

Prenatal dönemde antiepileptik ilaçlara maruz kalan 25.000 çocuğun katıldığı bir kohort çalışmasında nörogelişimsel bozukluk risk artışı incelenmiştir. Anneye monoterapi şeklinde uygulanan VPA tedavisinden sonra 2,4 (%95 GA, 1,7-3,3) ve topiramet tedavisinden sonra 2,8 (%95 GA, 1,4-5,7) kat OSB risk artışı olduğu görülmüştür. İkili terapilerden levitirasetam-karbamazepin ve lamotrijin-topiramet VPA ile benzer oranda risk artışına neden olurken levitirasetam-lamotrijin ikili terapisinin OSB riskini artırmadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu risk artışları antiepileptik dozlarıyla korele bulunmuştur. Lamotrijin, levitirasetam, karbamazepin, okskarbazepin, gabapentin, pregabalin, klonazepam veya fenobarbital ile prenatal dönemde monoterapi sonrasında nörogelişimsel bozukluklar için tutarlı bir risk artışı gözlenmemiştir [64].

2.4. Mevcut Tedaviler

OSB'nin temel semptomlarına yönelik bir medikal tedavi yoktur [3]. Ancak irritabilite ve agresyon tedavisinde risperidon ve aripiprazol, dopaminerjik ve serotonerjik antagonistik etkileri nedeniyle FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylı biçimde kullanılabilir [65]. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun eşlik ettiği vakalarda metilfenidat ve atomoksetin, reboksetin veya guanfasin reçete edilmektedir [66]. Uyku bozuklukları olan OSB'li bireyler melatoninden fayda görebilmektedir [67].

Beslenme desteği olarak sülfurafan kullanımının; bakım vericiler ve sağlık profesyonelleri tarafından uygulanan davranış değerlendirme ölçeklerinde skorları yükselttiği, irritabilite ve letarji gibi durumlarda fayda sağladığı bildirilmiştir. SFN, oksidatif stres yanıtını düzenleyen genlerin ekspresyonunda rolü olan Nrf2 yolağının aktivatörlerinden biridir. SFN'nin OSB'de kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir [7,68].

Günümüzde kanıta dayalı düzeyde OSB'nin temel semptomlarında iyileşme ancak özel eğitim ve terapi yaklaşımlarıyla sağlanabilmektedir [69]. Özellikle 5 yaş öncesinde tanı alan çocuklarda; erken yoğun davranışsal müdahale gibi davranışsal terapi

yaklaşımları sosyal iletişim, uyum sağlama davranışları, bilişsel beceriler ve dil gelişimi alanlarında iyileşme sağlayabilmektedir. İlerleyen yaşlarda da uygulanabilen gelişimsel terapi yaklaşımları, sosyal iletişimi iyileştirirken dil becerilerinde yeteri kadar etkin bulunmamıştır. Hem davranışsal hem gelişimsel terapi yaklaşımları kullanılarak uygulanan doğal gelişimsel davranışsal müdahaleler sonucunda da dil gelişimi, oyun becerileri ve sosyal iletişim alanlarında iyileşme sağlanabilmektedir [70]. Sosyal oyun becerileri ve sosyal etkileşim alanlarında grup terapilerinden fayda görülebilmektedir [71]. Buna ek olarak OSB'li bireylerde sıkça görülen özellikle duygudurum bozukluklarında bilişsel davranışçı terapi yöntemleri ile iyi sonuçlar alınabilmektedir [72].

2.5. OSB Etiyopatogenezi ile İlgili Teoriler

2.5.1. Oksidatif Stres

OSB'li çocukların özellikle erken postnatal dönemde yetersiz antioksidan savunma mekanizmaları nedeniyle artan lipid peroksidasyonu kaynaklı oksidatif strese karşı daha savunmasız oldukları gösterilmiştir [73-75]. OSB'li çocukların eritrositlerinde kontrole göre glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim düzeylerinin düşük, bununla birlikte reaktif oksijen ürünlerinin miktarının yüksek olduğu, total glutatyon miktarının ve GSH / GSSG (Glutatyon / Glutatyon disülfid) oranının azaldığı bildirilmiştir [76-79]. Metionin döngüsünün bozulduğu ve bunun da antioksidan sistemin önemli bileşenlerinden olan sistein ve glutatyonun sentezinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir [80]. OSB tanısı alan bireylerde plazma A,C ve E vitaminleri ile eritrositlerdeki çinko ve selenyum dahil eksojen antioksidanların seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir [81-83]. Ayrıca OSB'li bireylere antioksidan uygulanmasının ardından bazı OSB semptomlarında iyileşme olduğunu gösteren raporlar yayınlanmıştır. Çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, yüksek doz C vitamini veya karnozin uygulamasının uygulamanın başlangıcından itibaren OSB fenotipini iyileştirdiği gösterilmiştir [84].

Ayrıca OSB tanısı alan çocukların serumlarında majör antioksidan proteinler olan transferrin ve seruloplazmin düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu proteinlerin azalan seviyeleri ile çocuğun daha önce edindiği dil becerilerini kaybetmesi arasında güçlü bir korelasyon gözlemlenmiştir [77].

Antioksidan sistem yetersizliği bulgularına ek olarak OSB'li çocuklarda oksidatif stres biyobelirteçlerinin ekskresyonunun arttığı rapor edilmiştir [85]. Spesifik olarak F₂-izoprostan ve 8-izo-prostaglandin F_{2α} ekskresyonunun arttığı bildirilmiştir [86]. İzoprostan, araşidonik asidin enzimatik olmayan oksidasyonunun bir ürünüdür ve yaygın olarak lipid peroksidasyonunun güvenilir bir belirteci olarak kabul edilmektedir [87]. Son kanıtlar, 8-izoprostan ve sisteinil-lökotrienlerin OSB'nin erken tanısı için olası belirteçler olduğu hipotezini desteklemektedir [88]. Tüm bu bulgular, OSB patogenezinde oksidatif stresin son derece önemli olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır [85].

2.5.2. Bozulmuş İmmunite ve Nöroinflamasyon

OSB vakalarının yaklaşık %60'ında immun sistem disfonksiyonu bildirilmiştir [89-91]. Postmortem OSB medial frontal girus, anterior singulat korteks ve serebellum dokularında MCP1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), İL-6 (İnterlökin 6) ve TGFβ1 (*Transforming growth factor beta 1*)'in kontrole göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada hayatta olan OSB'li bireylerden alınan BOS örneklerinde kontrole göre MCP1 artışı saptanmıştır [92]. Farklı yöntemlerin ve küçük OSB hasta popülasyonlarının kullanıldığı birçok çalışmada, periferik kanda proinflamatuvar sitokinlerde artış olduğu gösterilmiştir [93-95]. Ancak literatüre bakıldığında sonuçların tutarlı olmadığı ve OSB'de birçok çalışmada gösterilen immun sistem disfonksiyonunun hastalarda görülen davranışsal fenotipler kadar heterojen olduğu görülmektedir [96].

Astroitler temel olarak kortikal organizasyon, nöronal migrasyon ve sinaptik plastisitede rol oynar [97,98]. Büyüme faktörleri üreterek ve glutamat gibi eksitotoksik nörotransmitterlerin sinaptik mikroçevredeki döngüsüne aracılık ederek nöronal sağkalımı etkilerler [99]. Bununla birlikte, kortikal hasara sekonder astroglial aktivasyon sırasında veya nöronal fonksiyon bozukluğuna yanıt olarak inflamatuvar süreçleri modüle edebilen proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve metaloproteinazlar üretirler [100]. Bu fonksiyonları göz önüne alındığında astroitlerin OSB patofizyolojisinde araştırılan; nöronal bağlantılar, nöronal migrasyon, sinaptogenez, eksitasyon/inhibisyon dengesizliği ve immun disfonksiyon teorilerinde ortak bir faktör olduğu görülebilir. Postmortem OSB BA40 (*Brodman area 40*), BA9, BA46, BA47,

serebellum, anterior singulat korteks beyaz cevherinde astrosit aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir [92,101-103]. Buna karşın postmortem OSB anterior singulat gri cevher, amigdala, anterior ve dorsolateral prefrontal beyaz cevher örneklerinde ise bir astrosit aktivasyon belirteci ara filament olan GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*)'in kontrolden farklı olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [103,104].

2.5.3. Nöral Bağlantılar

Merkezi sinir sistemi gelişiminde; erken dönemlerde çok fazla sinaps olduğu, ilerleyen dönemlerde seçici olarak sinaps eliminasyonu gerçekleştiği bilinmektedir. Yaşam boyunca sinapsların gelişimi ve devamlı düzenlenmesi, sağlıklı beyin matürasyonu için çok önemlidir [105]. OSB'de nöral bağlantıların bozulduğu ve sinaptogenezin farklı geliştiğine dair bulgular vardır. Hastaların %80-100'ünün OSB tanısı aldığı bilinen Rett sendromunda dendritik çıkıntılarda morfolojik anomaliler olduğu bildirilmiştir. MeCP2 mutasyonu sonucu sinaptik budanma ve matürasyon süreçlerinin bozulduğu öne sürülmüştür [106]. Postmortem OSB beyinlerinde temporal lobda bulunan katman 5 piramidal nöronlarda sinaptik budanmanın azaldığı ve buna bağlı dendritik çıkıntı yoğunluğunun arttığı görülmüştür [107]. Postmortem OSB prefrontal korteks kesitleri kontrollerle karşılaştırıldığında nöron sayısının belirgin artmış olduğu gözlenmiştir [108]. Bu durum nöral devrelerin şekillenmesi ve ince ayarı süreçlerinde farklılıklara sebep oluyor olabilir. OSB fenotipinin belirginleştiği ve tanının en sık konulduğu dönem olan ilk 3 yaşta nöron sayısı artışına bağlı beyin aşırı büyümesinin nöronal paternlerin ve bağlantıların düzensiz kurulmasına neden olduğu, aşırı lokal ve kısa mesafeli kortikal etkileşimlerin beyin bölgeleri arasındaki büyük ölçekli ve uzun mesafeli bağlantıları engellediği öne sürülmektedir [109]. OSB'de; piramidal nöronların (katman II-VI), internöronların (katman I-VI), aksonların ve dendritlerin radyal olarak oryante edilmiş dizilerinden oluşan ve alıcı alanları oluşturan makrokolonların temel birimi olan, minikolonlarda anormalliklerin gösterilmesi de intrahemisferik bağlantıların bozulduğu teorisini desteklemektedir. Prefrontal kortikal mikro devrelerin, çevreden alınan bilgileri bütünleştiren ve ardından davranışsal tepkileri seçip harekete geçiren algıdan eyleme döngüsünde önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır. Minikolon düzeyindeki aşırı bağlantıların nöral devrelerde gürültü yaratabileceği ve bu durumun bilginin verimli bir şekilde işlenmesini engelleyeceği öne sürülmektedir [110-112].

2.5.4. Bozulmuş Nöral Migrasyon

Bozulmuş nöral bağlantı teorisi ilk 3 yaşta meydana gelen anomalilere dayanırken nöral migrasyon bozukluğu teorisi, embriyonel göç döneminde nöronların alışlageldik göç yollarını izlemeyip farklı alanlara yerleşmesi ve beyin matürasyon süreçlerinin değişmesini esas almaktadır [105]. Postmortem OSB beyinlerinde subkortikal, periventriküler, hipokampal ve serebellar heterotopilerin olduğu görülmüştür [113]. OSB'de nöronal migrasyonda rolü olan RELN (Reelin), TBR1, CNTNAP2 (*Contactin-associated protein-like 2*) genlerinde mutasyonların olduğu gösterilmiştir [44,114-122].

2.5.5. Eksitasyon/İnhibisyon (E/İ) Dengesizliği

Eksitasyon/İnhibisyon dengesi, nöronal ağların düzgün işleyişi için kritiktir ve homeostatik mekanizmalar yoluyla korunmaktadır [123]. Nöronlar; iyon kanallarını, reseptörleri, sinyal yollarını ve nörotransmitterleri modüle ederek dengesizlikleri telafi edebilir. Moleküler düzeyde bu süreçler; kromatinin yeniden şekillenmesini, gen ekspresyonunda ve baskılanmasında değişiklikleri, protein sentezinde ve yıkımında değişiklikleri ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini gerektirir [124].

OSB etiyojisi hakkında yaygın olarak kabul edilen bir teori, nöronal devrelerde eksitatör-inhibitör dengesizliğin olduğudur [125].

E/İ dengesizliği glutamaterjik sinyallerdeki artışa veya GABAerjik sinyallemedeki azalmaya bağlı olabilir. Neokorteksteki E/İ oranı, piramidal glutamaterjik nöronların ve inhibitör GABAerjik parvalbumin (PV)-pozitif internöronların aktivitesi ile belirlenir ve minikolonlar tarafından modüle edilir. Bunlar, kendi içinde (*self-contained*) nöronal agregasyonlardan ve bunların nöronal mikro devrelerin etkileşimlerine aracılık eden afferent, efferent ve internöronal bağlantılarından oluşur ve OSB'de patolojik olarak değişikliğe uğrar [110,126]. Optogenetik kullanılarak, farelerde prefrontal korteksteki artan E/İ oranının, OSB'ye özgü davranışsal ve sosyal defisitlere yol açtığı gösterilmiştir [127]. Hastaların neredeyse tamamında OSB'nin eşlik ettiği Rett sendromunda azalmış E/İ oranı görülmüştür [128]. Postmortem OSB beyin örneklerinde; GABA'yı sentezleyen enzim GAD65 (*Glutamic acid decarboxylase*) ve GAD67'de, bu enzimleri kodlayan mRNA'da, GABA_A ve GABA_B reseptör alt tiplerinde değişiklikler bulunmuştur [129-134].

EEG kaydı ile izlenebilen Gama osilasyonları (30–90 Hz) E/İ dengesine bağlıdır. Kontrol ve OSB deneklerinde görsel uyaranların bağlamsal modülasyonuna verilen gama tepkisinin ölçüldüğü bir araştırmada, OSB'li bireylerde gama anomalileri saptanmıştır [135]. Tüm bu bulgular OSB'de E/İ dengesizliği teorisini desteklemektedir.

2.5.6. Zihin Teorisi

Bireyin diğer insanların zihinsel durumlarını ve duygularını anlama becerisine “zihin teorisi” adı verilmiştir [136]. OSB'li çocuklarda, iki kuklanın oyunu seremonisi üzerinden çocuklara yöneltilen sorulara dayanan psikolojik bir test aracılığıyla zihin teorisi becerileri değerlendirilmiş ve kontrole göre belirgin düzeyde defisit olduğu rapor edilmiştir [137]. fMRI (*Functional magnetic resonance imaging*) çalışmalarında zihin teorisi ile ilgili görevlerde aktive olan ana beyin bölgeleri incelendiğinde; süperior temporal girus ve inferior frontal girusta kontrol ve OSB grubu arasında aktivasyon farklılıkları bildirilirken insula ve amigdalada fark bulunmamıştır [138]. OSB'li bireylerde empati ve aleksitimi yetilerini değerlendirmek üzere olumlu, olumsuz ve nötr duygular uyandıran görsel uyaranlar eşliğinde fMRI görüntülemesi yapıldığında; MPFC (Medial prefrontal cortex), ACC (Anterior cingulate cortex), precuneus, sol temporal alan ve serebellum bölgelerinde kontrole göre önemli ölçüde düşük aktivite gösterdiği ve parietal ve oksipital korteks gibi daha arka bölgelerde yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür [139].

2.5.7. Kırık Ayna Teorisi

Parietal lob , premotor korteks, insula ve anterior singulat kortekste lokalize olan ayna nöronlar adı verilen nöron ağlarının, diğer insanların eylem ve duygularının tanınmasını ve anlaşılmasını sağladığı, empatiden sorumlu olduğu öne sürülmüştür [140]. OSB'li bireylerde ayna nöron sistemine ait alanlarda gri cevherin azaldığı görülmüştür. Duygu tanıma ve sosyal kognisyonla ilgili alanlarda da kortikal incelmeye gözlenmiş ve incelmeye düzeyi ile OSB semptom şiddeti arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir [141]. Ancak bu bulgular daha sonraki araştırmalarda tekrarlanamamış ve bozulmuş nöral aynalamanın OSB patofizyolojisinde önemli rolü olmadığı görüşü öne sürülmüştür [142-144]. OSB ve ayna nöron sisteminin ilişkisiyle ilgili ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.6. Deneysel OSB Modelleri

OSB patofizyolojisi ile ilgili bilinenler sınırlı olduğundan ve bozukluk, tanı alanlarda bir spektruma yayılmış şekilde görüldüğünden tüm OSB bulgularını kapsayan yaygın olarak kabul edilmiş bir hastalık modeli mevcut değildir. Ancak OSB'nin belirli yönlerini araştırmak üzere deney hayvanları üzerinde; genetik modifikasyon, ilişkili beyin bölgelerinde lezyon oluşturma ve gebelikte kimyasal veya biyolojik çevresel hasar maruziyeti ile oluşturulan modeller kullanılmaktadır.

Genom analiz yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde tanımlanan birçok OSB ilişkili genetik varyasyonla birlikte OSB'nin genetik modelleri de yaygınlaşmaya başlamıştır. Ayrıca tek gen anomalileriyle seyreden sendromik OSB'ler de hayvanlarda modellenabilmektedir [145]. Buna ek olarak BTBR *T+ tf/J*, BALB/*cByJ*, A/J ve 129S1/*SvlmJ* gibi bazı inbred suşlar doğuştan sosyal etkileşim yetersizliği gösterdiklerinden OSB modeli olarak kullanılmaktadır [146].

Erken postnatal dönemde, nöronal proliferasyon ve organizasyonun büyük oranda tamamlandığı ancak nöronal diferansiyasyon, myelinizasyon, sinaptogenez ve glia oluşumunun hala devam ettiği bilinmektedir. Bu hassas dönemde, OSB ile ilişkili olduğu bilinen beyin yapılarında; mekanik lezyon, elektroliz ve radyo frekans lezyonları, eksitotoksik veya nörotoksik ajanlarla lezyon oluşturulan modeller mevcuttur [105]. Eksitotoksik bir ajan olan ibotenik asidin yenidoğan sıçanlarda amigdalya ve medial prefrontal kortekse enjeksiyonları sonucu ilerleyen dönemlerde OSB benzeri fenotip görülmüştür [147,148]. Serebellar vermiste mekanik lezyon oluşturulan yenidoğan sıçanlarda da OSB benzeri semptomlar gözlenmiştir [149].

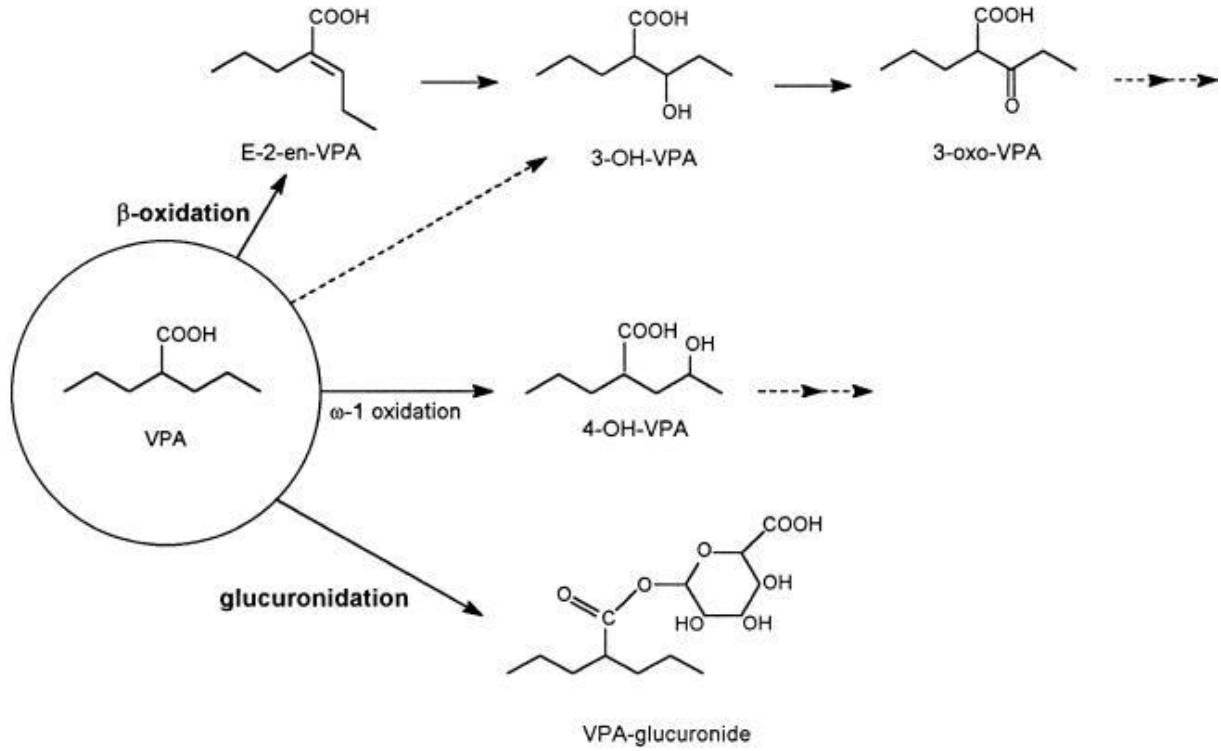
Maternal enfeksiyon, OSB riskini artırdığı bilinen çevresel faktörler arasında üst sıralarda yer almaktadır [57]. Gebe sıçanlarda viral veya bakteriyel enfeksiyonu taklit etmeye dayalı birçok OSB modeli vardır. Gebe hayvana farklı dozlarda LPS (lipopolisakkarid) enjeksiyonu ile bakteriyel maternal enfeksiyon taklit edilirken influenza virüsü veya bir TLR3 (*Toll-like receptor 3*) agonisti olan Poly I:C (*Polyinosinic-polycytidylic acid*) enjeksiyonu ile viral maternal enfeksiyon modelleri yapılmaktadır [150].

2.6.1. Valproik asit ve Valproik Asitle İndüklenen OSB Modeli

VPA, Burton tarafından 1882 yılında; hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunan, dallanmış, kısa zincirli bir yağ asidi olan valerik asidin bir türeği olarak sentezlenmiştir. Antikonvülzan özelliği ise Eymard tarafından 1962'de VPA'dan yeni bileşikler sentezlenmeye çalışılırken tesadüfi olarak keşfedilmiştir [151]. VPA ilk olarak 28 Şubat 1978'de FDA'dan Depakin ticari adı altında onay almıştır [152].

Günümüzde klinikte epilepsi, bipolar bozukluk tedavisinde ve migren profilaksisinde kullanılmakta olan valproik asidin prenatal tek doz enjeksiyonu OSB modellemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [153-157]. VPA'nın bilinen etki mekanizmaları arasında: Voltaj kapılı sodyum kanallarının inhibisyonu, GABA transaminazın inhibisyonu, GABA sentezinin arttırılması, HDAC (*Histone Deacetylases*)'lerin inhibisyonu ve T tipi, L tipi ve N tipi kalsiyum kanalları dahil olmak üzere çeşitli kalsiyum kanallarının modülasyonu vardır [151].

Yaklaşık %90'lık bir bağlanma oranıyla başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine güçlü afinite göstermektedir. VPA'nın fetal konsantrasyonu genellikle anne konsantrasyonunun %70-100'ü arasında değişir. VPA; karaciğerde oksidasyon, glukuronidasyon ve β -oksidasyonun yanı sıra karnitin veya glisin ile konjugasyonu içeren çeşitli yollar ile metabolize edilmektedir. VPA öncelikle UDP-glukuronosiltransferaz (UGT) enziminin aracılık ettiği glukuronidasyon yoluyla metabolize edilir ve bu yol, VPA'nın ana inaktif metaboliti olan valproat glukuronid oluşumuna yol açar. VPA'nın diğer ana metabolitleri arasında; 2-propil-4-pentenoik asit (4-ene-VPA), 2-propil-2-pentenoik asit (2-ene-VPA), 3-keto-VPA, 3-hidroksi-VPA ve valproil-CoA bulunur. VPA'nın primer eliminasyon yeri, metabolitlerinin idrar yoluyla atılmasını içeren böbreklerdir. Uygulanan VPA dozunun yaklaşık %30-50'si idrarla değişmeden atılır, geri kalanı ise metabolitler halinde atılır. Yarı ömrü 13-19 saat olarak bilinmektedir [151]. Oral VPA uygulaması için sıçanlarda LD₅₀ değeri: 670 mg/kg olarak belirlenmiştir [158].



Şekil 2.1. Valproik asit ve metabolitlerinin moleküler yapıları- McLaughlin DB ve ark. [159]'ndan alınmıştır.

Annenin VPA'ya maruz kalması (Fetal valproat sendromu) ile çocuklarda görülen OSB arasındaki olası bağlantı ilk olarak Christianson ve ark. tarafından 1994 yılında tanımlanmıştır [160]. Bu gözlemden yola çıkan Rodier ve ark. 1996'da prenatal VPA maruziyeti ile rodent OSB modeli oluşturma araştırmalarına başlamışlardır [161]. VPA ile indüklenen rodent OSB modelinin insanlarda görülen birçok yapısal ve davranışsal anomaliyi yansıttığı gösterilmiş ve bu yönüyle yüksek görünüm ve yapısal geçerliliğe sahip olduğu bilinmektedir [162].

VPA maruziyeti, embriyonik beyinde oksidatif strese ve histon deasetilaz inhibisyonuna neden olmaktadır. Her iki durum da prenatal VPA maruziyeti sonucu OSB benzeri davranışlara neden oluyor olabilir [157,163-165].

VPA, indirgenmiş glutatyonun konsantrasyonunu azaltır, antioksidan sistemin ana enzimleri olan glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenazın aktivitesini bastırır [166]. VPA ile tedavi edilen epilepsi tanılı çocuklardan alınan serum örnekleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında oksidan (MDA) düzeyi yüksek bulunurken antioksidan (E vitamini) düzeyi düşük bulunmuştur

[167]. Yüksek seviyedeki reaktif oksijen ürünleri ve olgunlaşmamış embriyonik antioksidan sistem, VPA'nın teratojenik etkisinin ortaya çıkmasını teşvik etmektedir [163]. Astaksantin, piperin ve yeşil çay ekstraktı gibi antioksidanların kullanılmasının, sıçanlarda ve farelerde VPA'nın neden olduğu OSB benzeri davranışı önlemede etkili olduğu gösterilmiştir [168].

VPA, gen transkripsiyon regülasyonunda önemli rol oynayan HDAC'yi inhibe etmektedir [164]. Aktif merkeze kompetitif bağlanarak HDAC₁ aktivitesini inhibe eder ve HDAC₂'nin proteozomal degradasyonunu indükler [169]. HDAC₁ nörogenez ve gliogenezden sorumludur ve hem nöral hem de glial kök hücrelerde eksprese edilir. HDAC₂ postmitotik nöroblastlarda eksprese edilirken diferansiyasyonu tamamlanmış glial hücrelerde eksprese edilmez [170].

2.7. Dimetil Fumarat

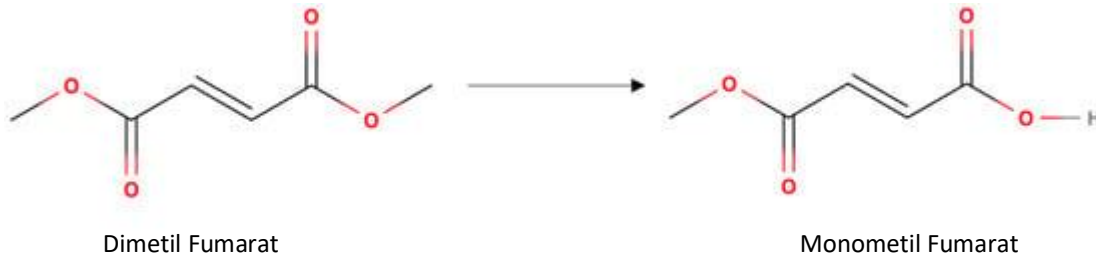
Dimetil fumarat, fumarik asidin dimetil esteridir. İmmunomodülatör ve antioksidan etkileri olduğu gösterilen bir ön ilaçtır [171].

İlk defa, kendisi de psöriazisten muzdarip olan olan Alman biyokimyacı Schweckendiek'in, fumarik asit esterlerinin inflamatuvar cilt hastalığındaki faydalarını vurgulaması ile 1959 yılında tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır [172]. Bu dönemde kombinasyon ve dozlamı ampirik olarak belirlenirken 1994 yılında, DMF ve monoetil fumarat tuzlarını içeren fumarik asit esterlerinin bir kombinasyonu, Alman İlaç İdaresi tarafından psöriazis tedavisi için Fumaderm® adı ile onaylanmıştır [173]. Daha sonra 2013 yılında FDA tarafından atak ve RRMS tedavisi, 2017 yılında EMA (*European Medicines Agency*) tarafından plak psöriazis tedavisinde kullanımı onaylanmıştır [8,171].

Oral yolla alındıktan sonra esterazlar aracılığı ile kısa sürede aktif metaboliti olan monometil fumarata (MMF) dönüştürülmektedir [173]. MMF'nin sistemik konsantrasyonları uygulamadan 2-2,5 saat sonra pik yapmaktadır ve plazma proteinlerine yaklaşık %50 oranında bağlanmaktadır [174]. *In vitro* çalışmalar, DMF'nin biyotransformasyonunun sitokrom P450 enzimlerini içermediğini ve MMF'nin bu enzimatik kompleksin indüktörü veya inhibitörü olarak herhangi bir rolü olmadığını göstermiştir. p-glikoprotein sistemiyle ve diğer efluks ve geri alım (uptake) taşıyıcıları

ile etkileşime girmez. Bu özellikler açısından DMF'nin önemli bir farmakokinetik etkileşimi yoktur [175]. MMF esas olarak CO₂ yoluyla elimine edilir, eser miktarda idrar ve gaita yoluyla atılır. MMF'nin eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 saattir [176].

Yan etkileri arasında en sık ciltte kızarıklık, gastrointestinal şikayetler olmak üzere lenfopeni ve hepatik transaminazlarda yükselmeler vardır. Tedavi esnasında lenfopeni (<500 hücre/mm³) ile ilişkili nadir progresif multifokal lökoensefalopati vakaları bildirilmiştir. Farelerde tümörlerle ilişkili olmayan en yüksek doz (75 mg/kg/gün), önerilen 480 mg/günlük insan dozuna eşdeğerdir [176].



Şekil 2.2. Dimetil fumaratın esteraz yoluyla monometil fumarata metabolizması

DMF'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Temel farmakolojik etkilerden biri Nrf2 transkripsiyon yolunun aktivasyonudur. Oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin büyük oranda Nrf2 yolağına bağlı olduğu düşünülmektedir [171]. *In vitro* çalışmalar, DMF'nin, elektrofilik bir ajan olarak KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) üzerindeki reaktif tipleri oksitlediğini ve onunla konjugasyon oluşturarak hücre içi antioksidan glutatyon stoklarının tükenmesine neden olduğunu göstermiştir. Tükenen glutatyon stoğuna yanıt olarak Nrf2 yolunun aktivasyonu tetiklenmektedir. Bu nedenle, DMF'nin çalışma prensibi, "hormesis" adı verilen toksikolojik mekanizma ile ilgilidir. Bu mekanizmaya göre potansiyel olarak zararlı oksidanların veya elektrofillerin subtoksik miktarları, Nrf2 yolunun aktivasyonu yoluyla moleküllerin toksik konsantrasyonlarına karşı hücre korumasını uyarabilir [177]. Fumaratların başlangıçta GSH'yi tüketmesi, apoptoza neden olacak kadar şiddetli değildir. Buna yanıt olarak yalnızca Nrf2 yolu aracılığıyla glutatyon ve glutatyonla ilişkili enzimleri *de novo*

artırarak değil, aynı zamanda GSH döngüsünü indükleyerek antioksidan telafi mekanizmalarını da desteklediği gösterilmiştir [178].

DMF bu yollardan bağımsız olarak PI3K/AKT/GSK-3 β (*Phosphatidylinositol 3-kinase/ Serine/threonine protein kinase/ Glycogen synthase kinase 3 beta*) yolunu indükleyerek de Nrf2 aktivasyonuna neden olabilmektedir [179]. Glikojen sentaz kinaz-3 β , Nrf2'nin Neh6 domaininde fosforilasyon sonucu ubiquitin-proteozom bozunmasını kolaylaştıran bir serin-treonin kinazdır. DMF'nin, GSK-3 β 'nin fosforilasyon durumunu değiştirerek fare hipokampusundeki aktivitesini azalttığı ve Nrf2'yi hedef alan bu proteolitik yolun down regülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Dolayısıyla DMF, KEAP1/Nrf2 kenetini bozarak veya Nrf2 yıkımını azaltarak Nrf2'nin aktivasyonunu 2 farklı yolla sağlayabilmektedir [180]. *In vivo* ve *in vitro* hayvan çalışmalarında; DMF uygulamasının, Nrf2 yolağı bağımlı olarak, antioksidan mekanizmada etkili enzimlerden biri olan NAD(P)H dehidrojenaz (NQO1) aktivitesini ve mRNA seviyesini artırdığı gösterilmiştir [181].

NF κ B (Nükleer faktör kappa B), önemli bir pro-inflamatuar transkripsiyon faktörüdür. DMF, NF κ B p65 alt birimi ile etkileşerek NF κ B'yi inhibe eder. Elektrofilik bir ajan olarak görev yapan DMF, p65 üzerindeki sistein kalıntılarının kovalent modifikasyonunu indükleyerek bu proteinin nükleer translokasyonunun ve fosforilasyonunun blokajına neden olur [182].

Fumaratlar, Th1 lenfosit fenotipinden Th2 lenfosit fenotipine ve sitokin paternine geçişi indükleyerek T hücrelerinin inflammatuar profilini modüle eder. Th1 ile aktive olan lenfositler, interferon- γ ve İL-17 salgılamalarıyla hem psöriazisin hem de MS'in patogeneğinde önemli bir rol oynar. MMF'nin, *in vitro* ortamda Th1 sitokinlerin üretimini baskılamadan, uyarılmış T hücrelerinde İL-4 ve İL-5 gibi Th2 ilişkili sitokinlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir [183]. DMF'nin dendritik hücre matürasyonunu inhibe ederek naif T hücrelerinin reaktif Th1 ve Th17 lenfositlere farklılaşmasını azalttığı görülmüştür [176].

Fumarik asit esterlerinin özellikle sinir dokusu üzerindeki sitoprotektif etkisi, HCAR2 (Hidrokarboksilik asit reseptörü 2) agonizması üzerinden de olabilir. HCAR2; nötrofiller, dendritik hücreler, makrofajlar ve mikroglia gibi birçok immun sistem hücresinde

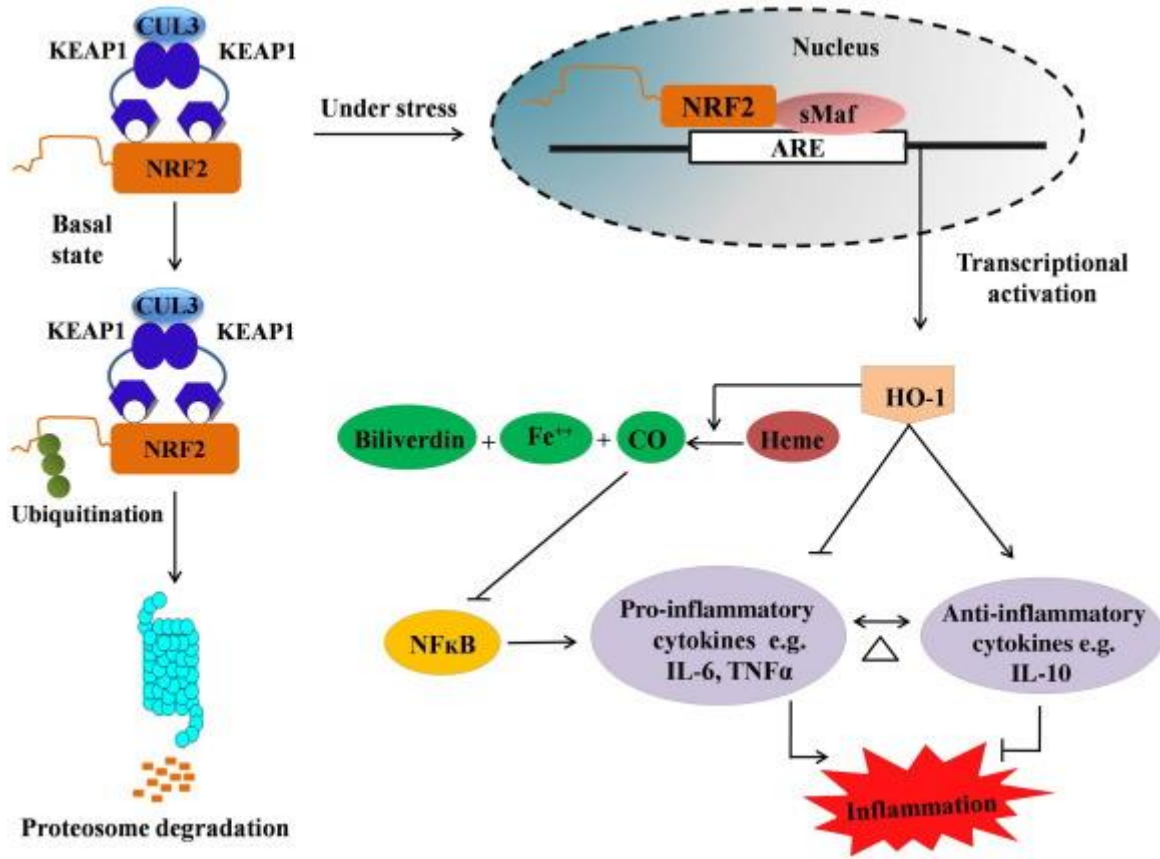
eksprese edilen ve Nrf2'den bağımsız olarak güçlü bir anti-inflamatuar sinyali aktive eden, nikotinik asit (niasin) için G proteinine bağlı bir reseptördür [184].

2.8. Nrf2 Yolağı

Nrf2, sitoprotektif genlerin ekspresyonunu düzenleyerek oksidatif stresi kontrol altında tutan bir transkripsiyon faktörüdür. Aşırı reaktif oksijen ürünü üretimi olduğunda sitoprotektif genlerin ekspresyonunu artırmaktadır [185].

Nrf2, fizyolojik koşullar altında sitoplazmada KEAP1 dimeri olarak bulunur. KEAP1, sistein kalıntıları içeren bölgeleri aracılığıyla redoks sensörü olarak çalışan bir çinko parmak proteindir [186]. Sağlıklı koşullar altında Nrf2'nin yıkımını teşvik ederken, oksidatif stres koşullarında Nrf2'yi serbestleştirerek antioksidan üretiminin artmasını sağlayan bir sensör gibi çalışmaktadır [185,187]. Aslında KEAP1, Nrf2'nin proteozomal degradasyonunu düzenleyen Cullin3 (Cul3) bazlı E3 ligaz için bir adaptör görevi görür. Artan oksidatif veya elektrofilik ajanların varlığında, KEAP1'de bulunan yüksek derecede reaktif sistein kalıntılarının oksidasyonu veya alkilasyonu gerçekleşir ve protein kompleksinin stabilitesi bozulur. Böylece Nrf2 artık bu yolla yıkıma uğratılamaz [188]. Kompleksten ayrılan Nrf2, sitoplazmadan çekirdeğe küçük Maf proteinleri ile heterodimer olarak hareket eder ve HO1 (hem oksijenaz1), kinolin oksidoredüktaz-1, katalaz, SOD (süperoksit dismutaz), glutatyon ve glutatyona bağlı antioksidan enzimler dahil olmak üzere sitoprotektif proteinleri kodlayan farklı hedef genlerin promotöründe ARE (*Antioxidant response element*) dizisini bağlayarak bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar [189].

Bu etkilere ek olarak oksidatif stres koşullarında, Nrf2-Keap1 yolağı aktivasyonu ile NfkB ve proinflamatuvar sitokinlerde azalma sonucu inflamatuvar yanıtın baskılandığı gösterilmiştir [190].



Şekil 2.3. Oksidatif stres koşullarında ve bazal koşullarda Nrf2 yolağının işleyişi-
Ahmed SMU ve ark. [185]'dan alınmıştır.

OSB'li çocukların monositlerinde Nrf2 aktivitesinin azaldığı, inflamasyon ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Aynı çocuklara Nrf2 aktivatörü SFN verilmiş, SFN'nin NfκB sinyalini etkileyerek inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerini azalttığı sonucuna varılmıştır [191].

Erken müdahale ile oksidatif strese bağlı hasarın kontrol altına alınmasının, OSB'nin geri dönüşsüz bir nörogelişimsel bozukluğa doğru ilerlemesini durdurabileceği düşünülmektedir [192]. Nrf2, oksidatif stresi ve sonunda OSB semptomlarını kontrol etmek için potansiyel bir hedef olarak düşünülebilir [193]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamız Sprague Dawley (SD) türü sıçanlar ile gerçekleştirildi. Gebelik oluşturmak için toplamda 13 adet 8-10 haftalık dişi SD sıçan (6 kontrol- 7 VPA) ve yaklaşık 350 gram ağırlığında 4 yetişkin erkek SD sıçan kullanıldı. Hayvanlar Kobay Deney Hayvanları A.Ş.'den satın alma yoluyla temin edildi. Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde 7 gün alışmaya bırakıldıktan sonra 1 dişi 1 erkek sıçan gece boyu aynı kafese bırakılarak gebelik oluşturuldu. Deneyler boyunca yavrular ve anneler Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı deney hayvanları odasında oda sıcaklığında (21 °C) ve 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünde barındırıldı. Bütün sıçanların deneyler süresince yem ve suya erişimleri *ad libitum* olarak sağlandı. Yavrular postnatal 3. günden itibaren gelişimsel takip testlerine alınmaya başlandı.

Çalışmamız, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2021/09-03 numaralı onay kararı ile gerçekleştirildi.

3.2. İlaçlar

VPA ile indüklenen sıçan OSB modeli için valproik asidin sodyum tuzu (Sigma, p4543) kullanıldı. Toz halindeki karboksimetilselüloz (CMC, Akbel Kimya), DMF'in vehikülü olarak çeşme suyu içinde %0,8 oranında çözülerek homojen halde hazırlandı. Dimetil fumarat (Sigma, 242926), süspansiyon formundaki %0,8'lik karboksimetil selüloz karışımı içinde oral gavaj yoluyla uygulandı.

3.3. Deney Hayvanlarında Gebeliğin Tespiti

Sekiz-on haftalık 1 dişi ve yaklaşık 350 gram ağırlığındaki 1 erkek Sprague Dawley sıçan bir gece boyunca aynı kafeste barındırıldı. Ertesi gün vajinal tıkaç ve/veya vajinal yaymanın ışık mikroskobu incelenmesinde sperm görülen dişiler gebeliğin 0. gününde kabul edildi (Bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Vajinal yaymanın ışık mikroskobu incelemesinde sıçan spermlerinin görünümü (40x büyütme).

3.4. VPA ile İndüklenen OSB Modeli Oluşturulması

Valproik asidin sodyum tuzu (Sigma, p4543), %0.9'luk fizyolojik salin içinde 100 mg/ml konsantrasyonunda çözüldü. Sprague Dawley türü gebe sıçana prenatal 12. günde, 400 mg/kg dozunda tek bir SC VPA enjeksiyonu yapıldı. Kontrol annelerine aynı dozda salin enjeksiyonu yapıldı [194]. Doğum gerçekleştikten sonra annelere yavrularını büyütme için süre verildi. Yavrular 23. günlük olduklarında süttten kesildi. Süttten kesilen yavrular cinsiyetlerine göre ayrı kafeslerde barındırıldı.

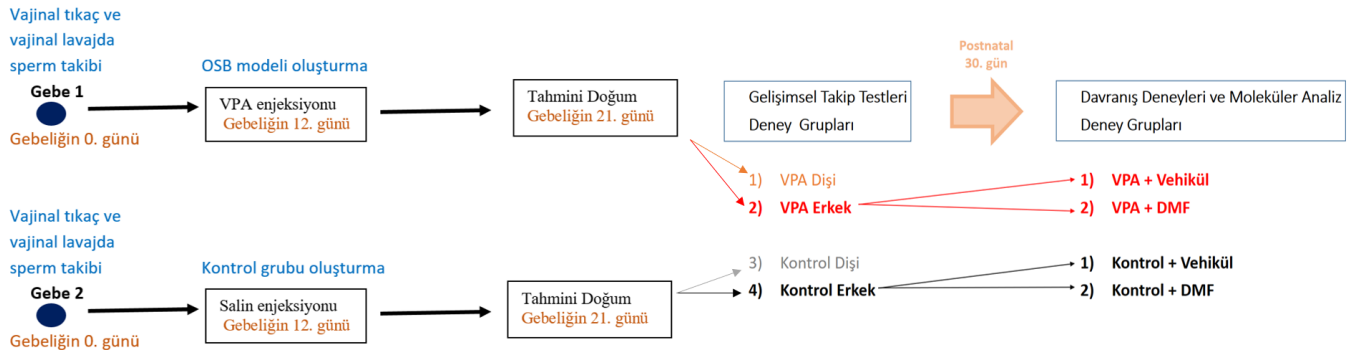
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

VPA ile indüklenen OSB modelinin gelişimsel takip parametreleri açısından kontrole göre ve cinsiyete özgü farklılıklara neden olup olmadığının incelenmesi için gelişimsel takip testlerine her iki cinsiyetteki yavrular dahil edildi. Bu ölçümler için oluşturulan gruplar aşağıdaki gibidir:

- 1) Kontrol Dişi
- 2) VPA Dişi
- 3) Kontrol Erkek
- 4) VPA Erkek

VPA ile indüklenen sıçan OSB modeli görünüm ve yapısal geçerliliğinin cinsiyete göre fark gösterdiği bildirilmiştir [195]. Dişilerde davranış deneyleri bulgularının östrus siklusundan etkilenmesi ve literatüre bakıldığında erkek sıçanlarda modelin daha başarılı olduğunun bildirilmesi gerekçeleriyle davranış testleri ve moleküler analizler için deney gruplarına yalnızca erkek sıçanlar dahil edildi. Postnatal 30. günden sonra kontrol annesi yavruları, yavru sayıları benzer olacak şekilde rastgele Kontrol+DMF ve Kontrol+vehikül gruplarına paylaştırıldı. Aynı şekilde VPA maruziyeti olan anneden doğan yavrular 30 günlük olduklarında VPA+DMF ve VPA+vehikül gruplarına paylaştırıldı. Bu şekilde çalışma aşağıdaki 4 grup üzerinde gerçekleştirildi (Bkz. Şekil 3.2):

- 1) Kontrol + Vehikül
- 2) Kontrol + DMF
- 3) VPA + Vehikül
- 4) VPA + DMF



Şekil 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.

3.5. Gelişimsel Takip Testleri

Prenatal VPA maruziyeti nedeniyle yavruların sensorimotor gelişimlerdeki değişimi takip etmek amacıyla palmar kavrama refleksi kazanılması, doğrulma testi, uçurumdan kaçınma, yürüme, negatif geotaksi ve akustik irkilme refleksi testleri yapıldı [196,197]. Prenatal VPA maruziyetinin fiziksel gelişim üzerindeki etkilerini takip etmek için: Vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve göz açılması parametreleri takip edildi. Sütten kesilme öncesi infant döneminde sosyal tanıma, bağlanma becerilerini değerlendirmek için anne kokusu tercih testi yapıldı [198].

3.5.1. Vücut Ağırlığı Ölçümü

Postnatal 7,14,21 ve 30. günlerde yavrular tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi.

3.5.2. Boy Uzunluğu Ölçümü

Postnatal 7, 14 ve 21. günlerde burun-anüs arası mesafe ölçüldü.

3.5.3. Göz Açılma Gününün Belirlenmesi

Postnatal 7. günden başlanarak yavruların göz açılması kontrol edildi. Her iki göz de kapalıysa 0, tek göz açıksa 1 her iki göz de açılmışsa 2 puan olarak değerlendirildi.

3.5.4. Palmar Kavrama Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi

Postnatal 3. günden başlanarak her bir ön ekstremitede avuç içine bir metal çubuk yerleştirildi ve hafif basınç uygulandı. Çubuğun etrafındaki tüm parmakların bükülmesi o ekstremitede için kavrama refleksi gelişmiş olarak değerlendirildi. Her iki ön ekstremitede başarılı kavrama varsa 2 puan, tek ekstremitede kavrama varsa 1 puan hiç kavrama yoksa 0 puan olarak değerlendirildi [197].



Şekil 3.3. Palmar Kavrama Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi.

3.5.5. Doğrulma Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi

Postnatal 3. günden başlanarak; yavrular 4 ekstremitesi de zemine dik olacak şekilde sırtüstü pozisyonda tutuldu. Ardından yavrular serbest bırakıldı ve zamanlayıcı başlatıldı. Yavru, dört ekstremitenin üzerinde yuvarlanabildiğinde ve her bir ekstremitte vücuda dik konumda yere bastığında doğrulanmış kabul edildi. Bu hedefe ulaşmak için her yavruya maksimum 15 s verildi. 15 s içinde dönemezse 0, ekstremiteleri dik pozisyona getirmeden yan dönebilirse 1, 4 ekstremitte vücuda dik şekilde tam dönerse 2 puan olarak değerlendirildi [197].



Şekil 3.4. Doğrulma Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi.

3.5.6. Doğrulma Testi

Postnatal 5. günde; yavrular 4 ekstremitesi de zemine dik konumda olacak şekilde sırtüstü pozisyonda sıkıca tutuldu. Ardından yavrular serbest bırakıldı ve zamanlayıcı başlatıldı. Test hayvanının 4 ekstremitesi de vücuduna dik şekilde doğrulabildiği süre kaydedildi.

3.5.7. Uçurumdan Kaçınma Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi

Postnatal 3. günden başlanarak yavrunun, ön ekstremiteleri ve burnu uçurumun kenarında olacak şekilde yerden 8 cm yükseklikteki düz bir zeminin kenarına yerleştirildi. Düşmeden kaynaklanabilecek travmaları önlemek için uçurumun altına köpük bir plaka yerleştirildi. Yavrunun uçurumun kenarından döndüğü ve düşmekten kaçındığı durum 2 puan olarak değerlendirildi, uçurumdan uzaklaşmaya çalışırken ekstremitelerin aşağı sarkıp asılı kaldığı durum 1 puan, düştüğü veya hareket etmediği durum 0 puan olarak değerlendirildi. Testin sonuçlandırılması için gerekli süre 30 s olarak kabul edildi. Ardışık 2 gün testten 2 puan alan hayvan test geçebildiği ilk gün testte başarılı kabul edildi [197].



Şekil 3.5. Uçurumdan Kaçınma Refleksi Değerlendirilmesi.

3.5.8. Yürüme Testini Tamamlayabilme Gününün Belirlenmesi

Postnatal 6. günden başlanarak yavrular, yumuşak zeminli 15 cm çaplı dairenin ortasına bırakıldı. 30 sn içinde yürüyerek daire dışına ön 2 ekstremitelerini çıkarabilenler başarılı olarak kabul edildi ve ardışık 2 gün testten 2 puan alan hayvan testi geçebildiği ilk gün testte başarılı kabul edildi [197].



Şekil 3.6. Yürüme Testi.

3.5.9. Yürüme Testi

Postnatal 14. günde yavrular, yumuşak zeminli 15 cm çaplı dairenin ortasına bırakıldı. 30 sn içinde yürüyerek daire dışına ön 2 ekstremitelerini çıkarabilenler başarılı olarak kabul edildi ve çıkış süreleri kaydedildi.

3.5.10. Negatif Geotaksi Testi

Postnatal 15. günde motor gelişimi ve proprioseptif duyu gelişimini test etmek için negatif geotaksi testi gerçekleştirildi. Pürüzlü kağıtla kaplanmış 45 derecelik eğimli yüzeye (yükseklik 28 cm, uzunluk 36 cm) yavrular yüzleri aşağı bakacak şekilde bırakıldı. Yerçekimine zıt yönde 180 derece dönerek yüzleri yukarı konuma bakacak şekilde oluncaya dek geçen süre kaydedildi. Düşen, hareket etmeyen veya testi 60 s içinde tamamlayamayan yavrular başarısız kabul edildi [199].



Şekil 3.7. Negatif Geotaksi Testi.

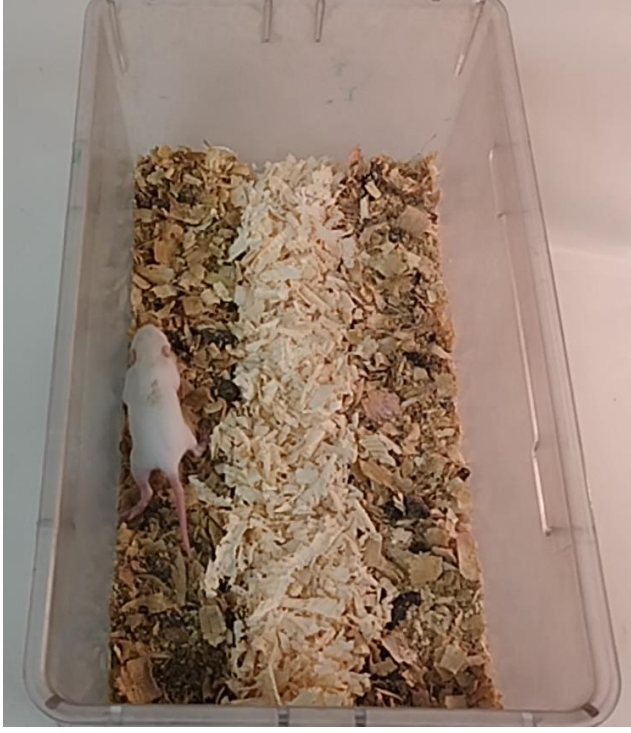
3.5.11. Akustik İrkilme Refleksi Kazanılmasının Değerlendirilmesi

Postnatal 10. günden başlanarak yavrular pamuklu kumaş zemine bırakıldı. Ardından bisiklet zili ile yaklaşık 5 cm yukardan sesli uyarın verildi. İrkilen ve sestən uzaklaşmaya çalışan yavrular irkilme refleksini kazanmış kabul edildi. Ardışık 2 gün irkilme refleksi görülen hayvanlar testten başarılı oldukları ilk gün irkilme refleksini kazanmış kabul edildi [197].

3.5.12. Anne Kokusu Tercih Testi

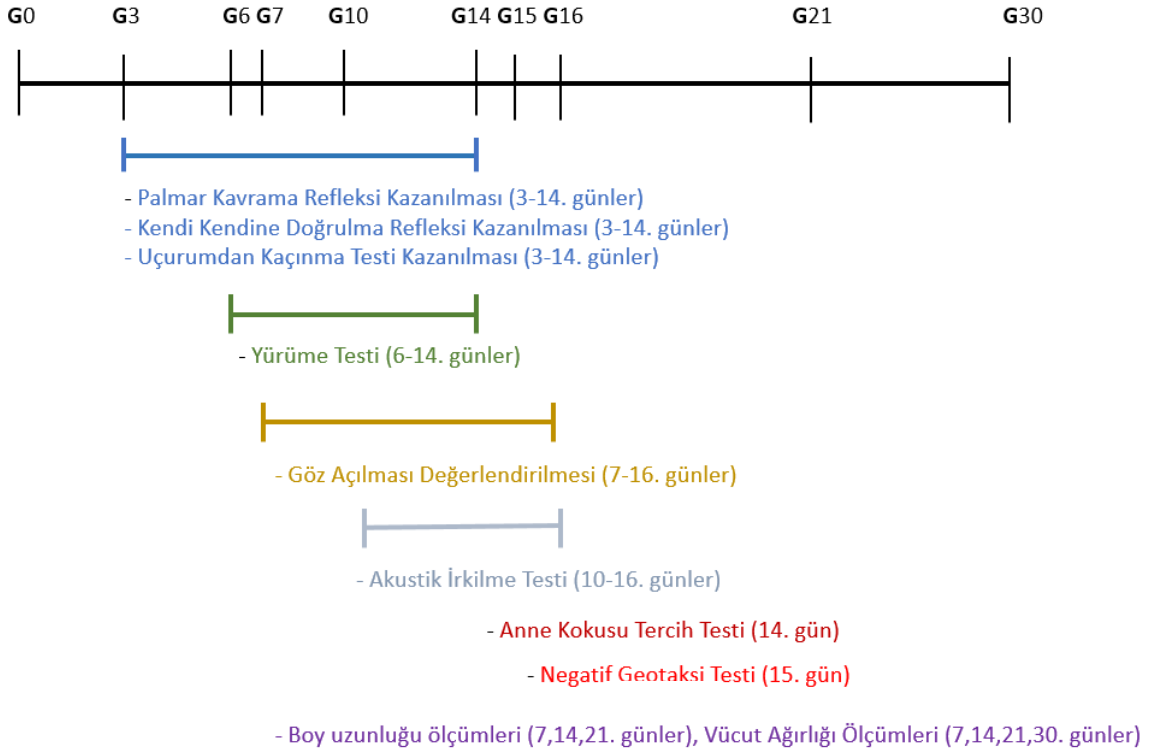
Sütten kesilmeden önce sosyal tanıma, bağlanma ve yabancı kokuya duyarlılık davranışlarını değerlendirmek için postnatal 14. günde anne kokusu tercih testi yapıldı [200]. Test; orta üçte birlik bölmesinde temiz talaş, sol üçte birlik bölmesinde annenin kafesinden gelen talaş, sağ üçte birlik bölmesinde ise yabancı bir anne ve yavrularının kafesinden gelen talaşla dolu olan 20x30x15 cm boyutlarındaki test kafesinde gerçekleştirildi. Talaşlar 3 cm yüksekliğinde olacak şekilde hazırlandı. Test edilen yavrular yanlılığı önlemek için her aşamada farklı bölmeye doğru bırakıldı. Her yavru için aşamalar arası 10 saniye bırakılarak üç 1 dakikalık aşama gerçekleştirildi. İlk aşamada yavrular, test kafesinin arka duvarına bakan temiz talaşın ortasına yerleştirildi. İkinci aşama için yavrular, temiz talaşın ortasına, annesinin kafesinden alınan talaş içeren bölüme bakacak şekilde yerleştirildi. Üçüncü aşama için yavrular

yabancı annenin kafesinden alınan talaşı içeren bölüme karşı kafese bırakıldı. Kafesin her bölümünde harcanan zaman kaydedildi ve 3 deneme boyunca anne talaşı zonunda ve yabancı talaş zonunda geçirilen sürelerin ortalaması alındı. Yavru, belirtilen bölge içinde 4 ekstremitenin tümü talaşa dokunduğunda bölümün içinde kabul edildi. Testin tüm aşamaları kamera ile kayıt altına alındı [198,201].



Şekil 3.8. Anne Kokusu Tercih Testi

Gelişimsel Takip Testleri Planı



Şekil 3.9. Gelişimsel Takip Testleri Planı.

3.7. Oral Gavaj Uygulamaları

Postnatal 30. günden başlanarak 5 hafta boyunca 100 mg/kg/gün oral gavaj yoluyla DMF uygulaması yapıldı. Gavaj uygulamaları boyunca her gün hayvanlar tartılıp 100 mg/kg dozuna karşılık gelen miktardaki DMF; 2,5 ml/kg %0,8'lik CMC içinde süspansiyon edilerek her bir hayvan için 2 ml'lik eppendorf tüplerinde günlük olarak hazırlandı ve uygulandı.

3.8. Davranış Deneyleri Planı

Davranış deneyleri her bir hayvan için 2 günde ve aşağıda belirtilen sırada tamamlandı:

1.gün:

- 1) Grooming testi
- 2) Misket gömme testi
- 3) 3 odacıklı sosyal etkileşim testi

2. gün:

- 1) Yükseltilmiş artı testi
- 2) Açık alan testi

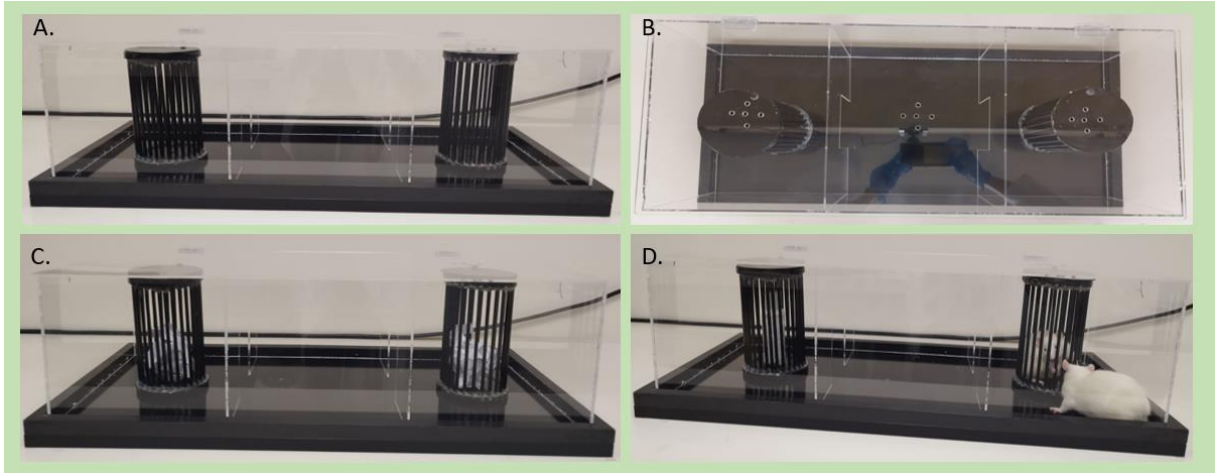
Testler deney hayvanlarının gün döngüsünde aydınlık dilime denk gelecek şekilde, en az anksiyete oluşturan testten başlanarak yapıldı. Her bir test istatistiksel analize dahil edilecek tüm hayvanlar için aynı zaman dilimine denk gelecek şekilde uygulandı. Tüm hayvanlarda aynı test sırası izlendi. Testler o gün uygulanacak tüm deney hayvanları için tamamlandığında bir sonraki teste geçildi.

3.9. Davranış Deneyleri

3.9.1. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi

Sosyal etkileşim bozukluğunu değerlendirmek amacıyla 3 odacıklı sosyal etkileşim testi yapıldı [202]. Test düzeneği, 30x70 cm ebatlarında siyah tahta zemin üzerinde 20 cm yüksekliğinde ve üstünde tek parça kapağı olan şeffaf pleksiglass duvarlarla çevrili 3 eşit bölmeden oluşmaktaydı. Düzenekte aralarında 10x10 cm'lik geçitler bulunan 3 adet eşit bölme ve yan bölmelerin içinde 11 cm çaplı 19 cm yüksekliğinde ve 1 cm aralıklı demir parmaklıklardan oluşan siyah kafesler bulunmaktaydı. Test protokolü, iki farklı protokolün modifiye edilmesi ile hazırlandı [202,203]. Deney hayvanları testten en az 1 saat önce laboratuvara alındı. Protokol; alışma, ön test ve sosyal tercih testi olmak üzere 3 aşamada tamamlandı. Alışma aşamasında, test hayvanı nazikçe orta bölmeye bırakıldı ve 10 dk boyunca düzeneği keşfetmesi beklendi. On dk'lık sürenin

bitiminde test hayvanı aparattan alındı ve dinlenmesi için kafesine götürüldü. Düzenek alkolle silinip kurumaya bırakıldı. Ardından ön test aşamasında, yan bölmelerin ortasında bulunan kafeslerin merkezine buruşturulmuş beyaz kağıtlar bırakılıp 10 dk boyunca test hayvanının tel kafeslerin içindeki nesnelere farketmesi beklendi. Bu aşamadan sonra da test hayvanı kafesine alınıp dinlendirilirken düzenek %70'lik etil alkolle temizlendi. Sosyal etkileşim testi aşamasında, tel kafeslerin birine sosyal olmayan uyaran olarak içi pamukla doldurulmuş 10 cm yüksekliğinde şeffaf plastik şişe yerleştirildi. Diğer kafese ise test hayvanıyla benzer yaş, tür ve cinsiyette yabancı bir sıçan yerleştirildi. Test hayvanı orta zondan bırakılarak 10 dk boyunca hayvanın cansız nesne zonunda ve sosyal uyaran zonunda geçirdiği süreler kaydedildi (Bkz. Şekil 3.12). Kayıtlar Toxtrack 2.96 video takip yazılımı (Umeå University, Sweden) ile analiz edildi.

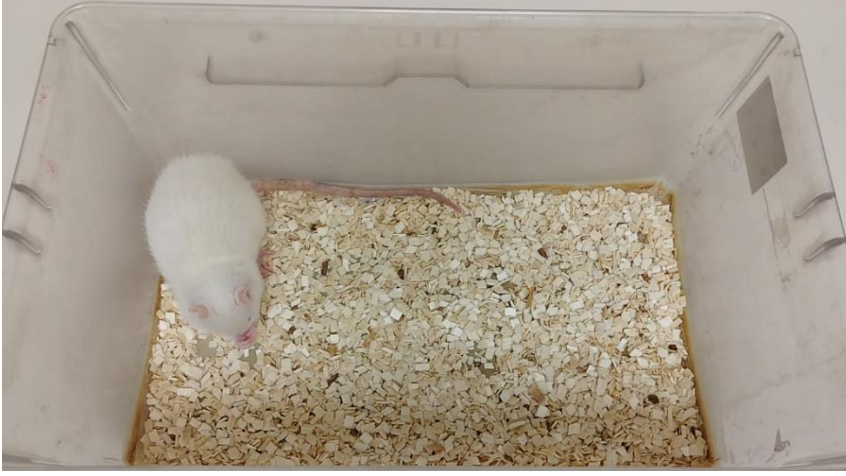


Şekil 3.10. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi. A. Test düzeneğinin önden görünümü. B. Test düzeneğinin üstten görünümü. C. Ön test aşaması öncesi. D. Sosyal etkileşim testi aşaması.

3.9.2. Grooming Testi

Bu test sıçanlarda stereotipi ve obsesif kompulsif davranışları gözlemlemek için gerçekleştirildi. OSB'de tekrarlayıcı davranışların arttığı bilinmektedir [204]. Bu durumun VPA ile indüklenen OSB modelindeki karşılığı araştırılmak istendi. Deneiden

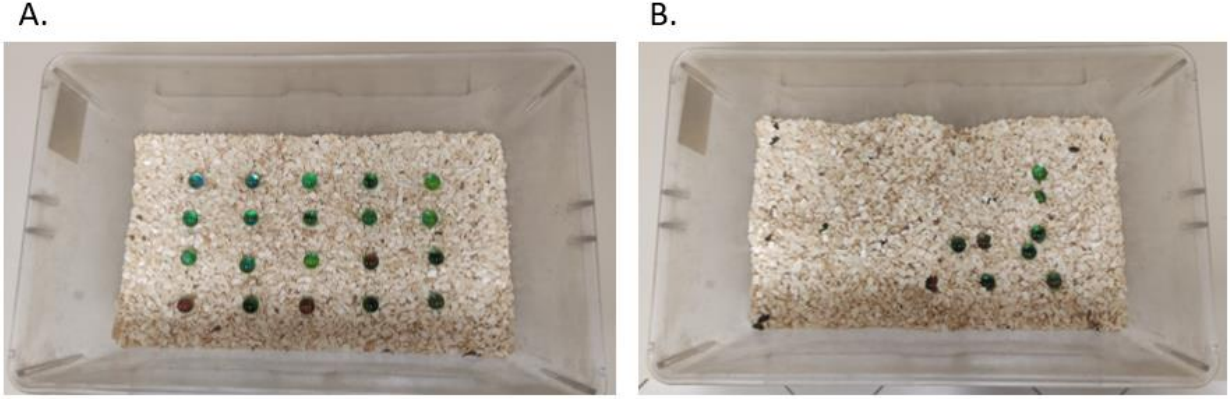
nce, her bir sıçan, kazma davranışını tetiklemeyecek kadar sığ bir şekilde temiz talaşla kaplanmış orta boy polikarbonat kafese yerleştirildi ve 10 dakika boyunca ortama alışmaları sağlandı. Ardından 10 dakika boyunca hayvanın hareketleri video kaydına alındı. Kümülatif self grooming süresi hesaplandı.



şekil 3.11. Grooming Testi.

3.9.3. Misket Gömme Testi

Bu test ile sıçanlarda kompulsif benzeri davranış paterni değerlendirildi [196,205]. Her bir sıçan, temiz ve kokusuz talaş (yaklaşık 5 cm yüksekliğinde) zerinde, 5 × 4 şeklinde 20 adet misket dizili olan polikarbonat kafese (uzunluk: 26 cm, genişlik: 48 cm, derinlik: 20 cm) yerleştirildi. Misketler her kullanımdan önce %70'lik etil alkol ile silinip kurutuldu. Testin başlangıcında sıçanlar tek tek kutunun aynı köşesinden bırakıldı ve 30 dakikanın sonunda en az 2/3' gömülü şekilde bulunan misket sayısı kaydedildi.



Şekil 3.12. Masket gömme testi. A. Test öncesi deney düzeneğinin görünümü. **B.** Test sonrası gömülü misketlerin görünümü.

3.9.4. Yükseltilmiş Artı Testi

Yükseltilmiş artı testinde anksiyete düzeyi azaldıkça açık kolda geçirilen sürenin arttığı bilinmektedir. Anksiyolitik ilaç uygulanan hayvanların test boyunca açık kolda geçirilen toplam süreleri yüksek bulunmuştur [206]. Bu test sıçanların anksiyete düzeylerini değerlendirmek için uygulandı. Yükseltilmiş artı testi aparatı; karşılıklı iki kolu açık, karşılıklı iki kolu kapalı, artı şeklinde birbirlerine dik yerleştirilmiş dört koldan oluşmaktaydı. Kolların eni 15 cm, boyu ise 45 cm idi. Aparat, ayakları aracılığıyla yerden bir metre yükseltildi. Yüzü, açık kollardan birine dönük olarak bırakılan test sıçanının 5 dakika boyunca video kaydı alındı. Daha sonra açık kollarda geçirilen toplam süre Toxtrack 2.96 video takip yazılımı (Umeå University, Sweden) yazılımı ile analiz edildi.



Şekil 3.13. Yükseltilmiş artı testi.

3.9.5. Açık Alan Testi

Bu test sıçanların lokomasyonlarını ve anksiyetelerini değerlendirmek için gerçekleştirildi [207]. Kenar uzunluğu 45 cm olan kare biçimli üstü açık cam düzenek içine konulan sıçanların 60 dakika boyunca hareketleri video kaydına alındı. Testin sonunda katedilen toplam mesafe ile alanın periferinde ve merkezinde geçirdikleri süreler Toxtrack 2.96 video takip yazılımı (Umeå University, Sweden) yazılımı aracılığıyla belirlendi.



Şekil 3.14. Açık alan testi.

3.10. Prefrontal Korteks ve Serebellar Vermis Dokularının İzolasyonu

Beş haftalık oral gavaj uygulamasının ve davranış deneylerinin bitiminde deney hayvanları 1,4 g/kg üretan anestezisi altında dekapite edildi. Beyin hızla çıkarılıp buz üzerinde fizyolojik salinle ıslatılmış filtre kağıdı kaplı petri kabı üzerine alındı. Beyin sapı uzaklaştırıldı. Ardından serebellum diseke edildi. Serebellar hemisferler ve vermis bistüri yardımıyla ayrıldı. Serebellar vermisin orta 1/3'lük kısmı izole edildi. Ardından serebral hemisferler sulkus sentralisten ayrıldı. Sol prefrontal korteks, serebral hemisferin medial yüzünde corpus callosumun hemen önünden geçen bir kesi atılarak izole edildi [208,209].

3.11. Doku Homojenatlarından Tüm Hücre Protein Ekstraksiyonlarının Yapılması ve Örneklerin Saklanması

Serebellar vermisin orta 1/3'lük kısmı ile sol prefrontal korteks tartıldı. Ardından serebellar vermis ve sol PFC dokularına Active Motif® nükleer ekstraksiyon kitinde (Cat No:40010) belirtilen doku homojenatından tüm hücre protein ekstraksiyonu protokolü uygulandı. Vermis ve sol PFC tüm hücre ekstraktları ELISA ve TAS, TOS ölçümlerinde kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.12. Total Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Eksi seksen santigrat derecede saklanan serebellar vermis ve sol PFC tüm hücre ekstraktları çözdürüldü. Her bir ekstraktan 10 µl numune alındı. Ardından BCA kolorimetrik protein konsantrasyonu ölçüm kiti (Elabscience, E-BC-K318-M) protokolüne göre her bir numunenin total protein konsantrasyonu belirlendi.

3.13. Oksidatif Stres İlişkili Belirteçlerin Ölçümü

3.13.1. TOS Ölçümü

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat kolorimetrik TOS (Cat. No: E-BC-K802-M) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı.

3.13.2. TAS Ölçümü

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat kolorimetrik TAS (Cat. No: E-BC-K801-M) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı.

3.14. Nöroinflamasyon İlişkili Belirteçlerin Ölçümü

3.14.1. TNF α ELISA

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat TNF α ELISA (Cat. No:E-EL-R2856-96T) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı. Optik dansiteleri bilinen numunelerin, standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımında non-lineer 4 parametrelili lojistik eğri analizi ile TNF α konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon oranı ile çarpılarak numunelerdeki TNF α değerleri elde edildi.

3.14.2. İL-6 ELISA

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat İL-6 ELISA (Cat. No: E-EL-R0015-96T) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı. Optik dansiteleri bilinen numunelerin, standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımında non-lineer 4 parametrelili lojistik eğri analizi ile İL-6 konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon oranı ile çarpılarak numunelerdeki İL-6 değerleri elde edildi.

3.14.3. MCP1/CCL2 ELISA

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat MCP1/CCL2 ELISA (Cat. No: E-EL-R0633-96T) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı. Optik dansiteleri bilinen numunelerin, standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımında non-lineer 4 parametrelili lojistik eğri analizi ile MCP1/CCL2

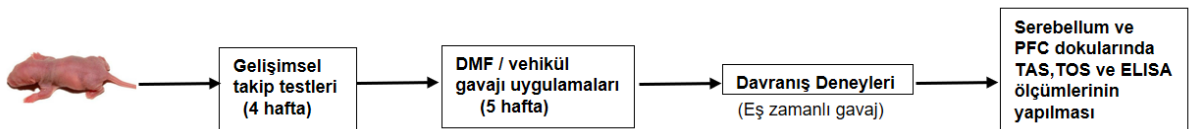
konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon oranı ile çarpılarak numunelerdeki MCP1/CCL2 değerleri elde edildi.

3.14.4. TGF β ₁ ELISA

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat TGF β ₁ ELISA (Cat. No: E-EL-0162-96T) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı. Optik dansiteleri bilinen numunelerin, standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımında non-lineer 4 parametrelili lojistik eğri analizi ile TGF β ₁ konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon oranı ile çarpılarak numunelerdeki TGF β ₁ değerleri elde edildi.

3.14.5. GFAP ELISA

Tüm hücre protein ekstraksiyonu sonrası -80 °C'de saklanan serebellum ve sol prefrontal korteks doku homojenatlarına 1:10 oranında dilüsyon uygulandı. Total protein konsantrasyonu ölçümü sonrası her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklenip Elabscience rat GFAP ELISA (Cat. No:E-EL-R1428) kiti prosedürlerine göre ölçüm yapıldı. Optik dansiteleri bilinen numunelerin, standart konsantrasyonlarından yola çıkılarak Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımında non-lineer 4 parametrelili lojistik eğri analizi ile GFAP konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon oranı ile çarpılarak numunelerdeki GFAP değerleri elde edildi.



Şekil 3.15. Araştırma Protokolünün Şematik Özeti

3.15. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, Graphpad Prism 6.2 (San Diego, California, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı.

Tüm deney gruplarında, dağılımı belirlemek için normalite testi olarak; *Kolmogorov-Smirnov*, *Shapiro Wilk* ve *D'Agostino & Pearson omnibus* testleri uygulandı.

Kontrol dişi, Kontrol erkek, VPA dişi, VPA erkek grupları bulgularında; parametrik analizler için tek yönlü varyans analizi (*ANOVA*), non-parametrik analizler için *Kruskal Wallis* testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü *ANOVA* sonrası *posthoc* olarak *Tukey* testi, *Kruskal Wallis* sonrası *posthoc* olarak *Dunn* testi uygulandı. Anne kokusu tercih testi bulgularının analizinde yapılan ikili karşılaştırmalarda parametrik analizlerde *Bağımsız Örneklem t testi*, non-parametrik analizlerde ise *Mann-Whitney* testi uygulandı.

Kontrol+CMC, VPA+CMC, Kontrol+DMF ve VPA+DMF gruplarında; parametrik analizler için tek yönlü varyans analizi (*ANOVA*), non-parametrik analizler için *Kruskal Wallis* testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü *ANOVA* sonrası *posthoc* olarak *Tukey* testi, *Kruskal Wallis* sonrası *posthoc* olarak *Dunn* testi uygulandı.

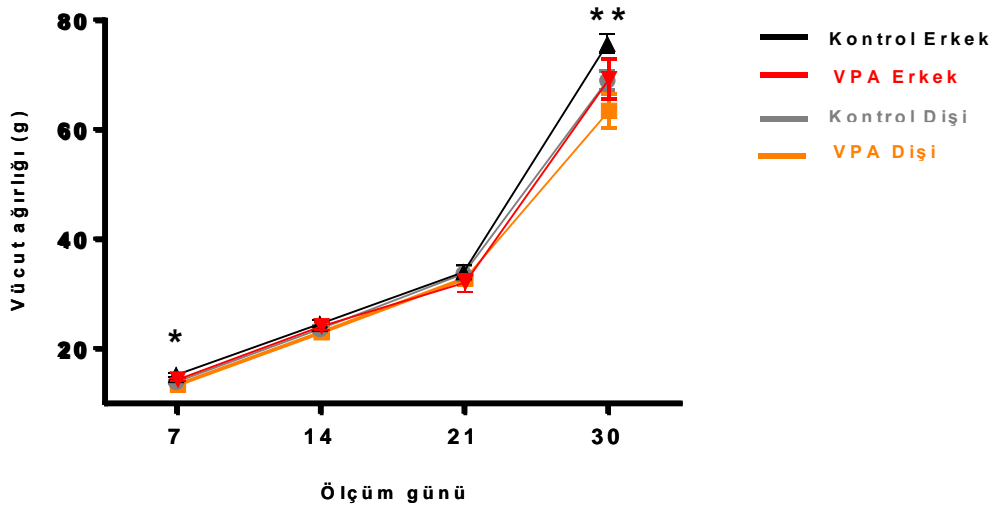
Veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM, *standard error of mean*) olarak ifade edildi. $p < 0,05$ anlamlılık eşik değeri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gelişimsel Takip Testleri Bulguları

4.1.1. Vücut Ağırlığı Ölçümlerinin Karşılaştırılması

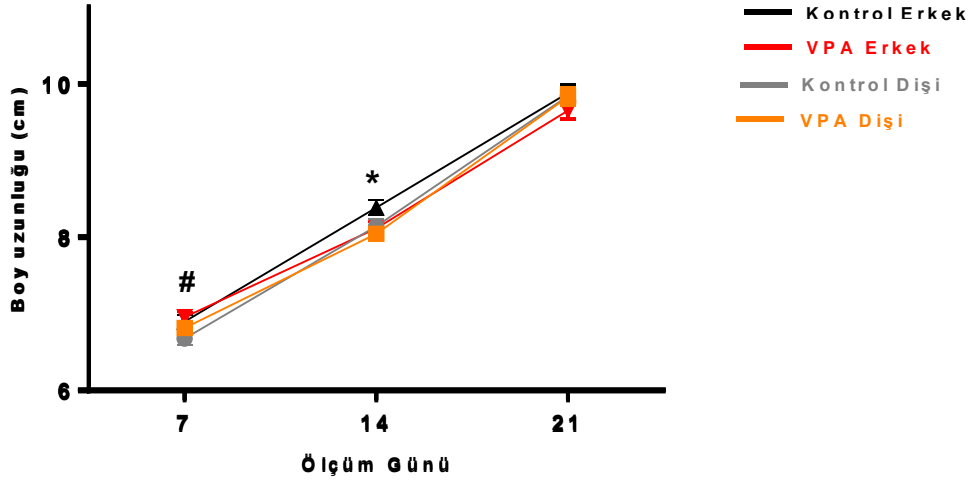
Yedinci günde ($p=0,009$) ve 30. günde ($F(3,101)=3,853$; $p=0,011$) yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinde gruplar arasında fark bulundu. Yedinci ($p=0,01$) ve 30. gün ($p=0,007$) ölçümlerinde kontrol erkek grubu vücut ağırlıkları VPA dişi grubuna göre yüksekti. On dört ve 21. gün ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.1. Vücut ağırlıklarının karşılaştırılması. Yedinci ve 21. gün ölçümlerinde *Kruskal Wallis testi* ve *posthoc Dunn testi* kullanıldı. 14. ve 30. gün ölçümlerinde tek yönlü ANOVA ve *post hoc Tukey testi* kullanıldı (Kontrol Dişi: $n=31$, VPA Dişi: $n=19$, Kontrol Erkek: $n=31$, VPA Erkek $n=23$) $*p<0,05$, $**p<0,01$.

4.1.2. Boy Uzunluğu Ölçümlerinin Karşılaştırılması

Yedinci günde $\{F(3,114)=3,518; p=0,017\}$ ve 14. günde $\{F(3,114)=3,385; p=0,02\}$ yapılan boy uzunluğu ölçümlerinde gruplar arasında fark bulundu. Yedinci gün ölçümlerinde VPA erkek grubu boy uzunluğu kontrol dişi grubuna göre yüksek bulundu ($p=0,019$). On dördüncü gün ölçümlerinde kontrol erkek grubu boy uzunluğu VPA dişi grubuna göre yüksek bulundu ($p=0,025$). 21. güne gelindiğinde gruplar arasında anlamlı fark kalmadığı görüldü.



Şekil 4.2. Boy uzunluklarının karşılaştırılması. Tüm ölçüm günlerinde *tek yönlü ANOVA* ve *post hoc Tukey testleri* kullanıldı (Kontrol Dişi: $n=30$, VPA Dişi: $n=25$, Kontrol Erkek: $n=31$, VPA Erkek: $n=32$) VPA dişi – Kontrol Erkek $*p<0,05$. VPA Erkek-Kontrol Dişi $\#p<0,05$.

4.1.3. Nörogelişimsel Parametrelerin Değerlendirilmesi

Doğrulma testinin kazanılma gününde gruplar arasında fark görüldü ($p<0,0001$). VPA Dişi grubunda doğrulma refleksinin kazanılması; Kontrol Dişi grubu ($p<0,01$), Kontrol Erkek grubu ($p<0,01$) ve VPA erkek grubuna ($p<0,0001$) göre gecikti.

Palmar kavrama, uçurumdan kaçınma, yürüme, göz açılması ve akustik irkilme reflekslerinin kazanılması bakımından gruplar arasında fark bulunmadı.

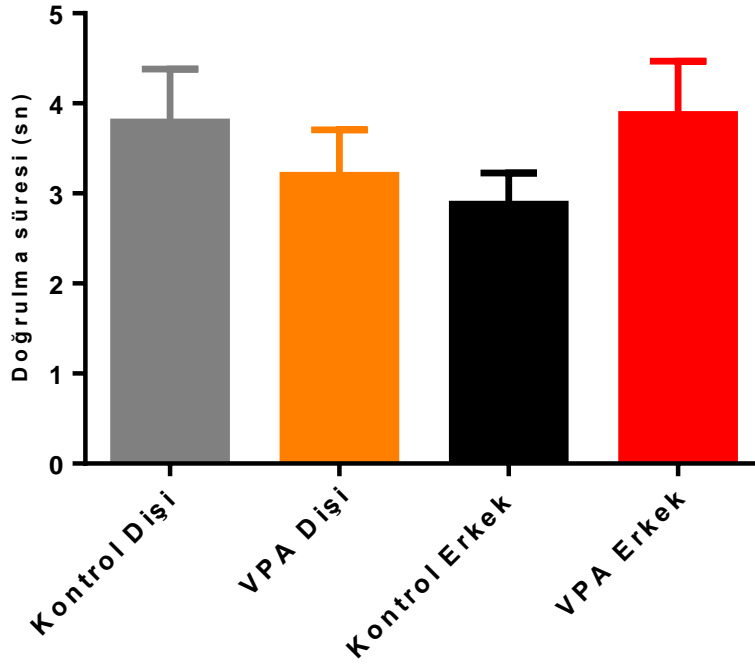
Tablo 4.1. Nörogelişimsel Parametrelerin Karşılaştırılması

| Nörogelişimsel Parametreler | Kontrol Dişi | VPA Dişi | Kontrol Erkek | VPA Erkek |
|---|-----------------|------------|-----------------|------------|
| Palmar Kavrama Refleksi Kazanılma Günü | 3,32±0,18 | 3 | 3,44±0,24 | 3,04±0,04 |
| Doğrulma Refleksi Kazanılma Günü | 3,12±0,08 ** | 3,65±0,18 | 3,12±0,08 ## | 3 aaaa |
| Uçurumdan Kaçınma Refleksi Kazanılma Günü | 3,88±0,23 | 4,33±0,21 | 3,84±0,23 | 3,83±0,22 |
| Yürüme Testini Tamamlayabilme Günü | 8,56±0,40 | 8,61±0,39 | 8,8±0,45 | 9,17±0,41 |
| Göz Açılma Günü | 14,7±0,18 | 14,6±0,19 | 14,65±0,11 | 14,75±0,19 |
| Akustik İrkilme Refleksi Kazanılma Günü | 12,21±0,12 | 12,68±0,19 | 12,35±0,15 | 12,48±0,19 |

Yürüme testi ve akustik irkilme testinde *Tek yönlü ANOVA testi* ve *post hoc Tukey testi*, diğer testlerde *Kruskal-Wallis testi* *post hoc Dunn's testi* uygulandı (Kontrol Dişi: $n=25$, VPA Dişi: $n=25$, Kontrol Erkek $n=20$, VPA Erkek: $n=25$) ** : Kontrol Dişi VPA Dişi $p<0,01$, ##: Kontrol Erkek-VPA Dişi $p<0,01$, aaaa: VPA Dişi-VPA Erkek $p<0,0001$.

4.1.4. Doğrulma Testi Bulguları

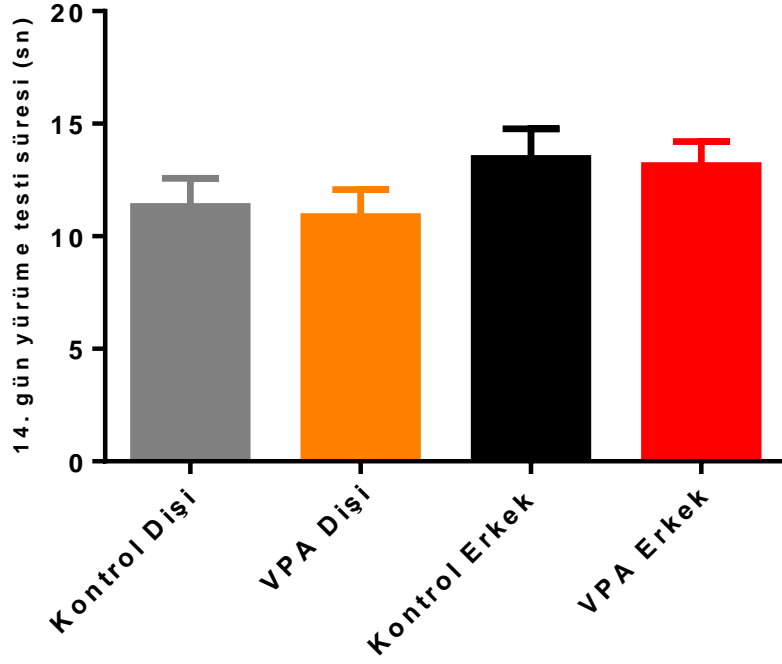
Beşinci günde yapılan doğrulma testini tamamlama süreleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı.



Şekil 4.3. Doğrulma testi sürelerinin karşılaştırılması. *Kruskal-Wallis testi* ve *post hoc Dunn's testi* uygulandı (Kontrol Dişi: $n=24$, VPA Dişi: $n=20$, Kontrol Erkek: $n=25$, VPA Erkek: $n=24$).

4.1.5. Yürüme Testi Bulguları

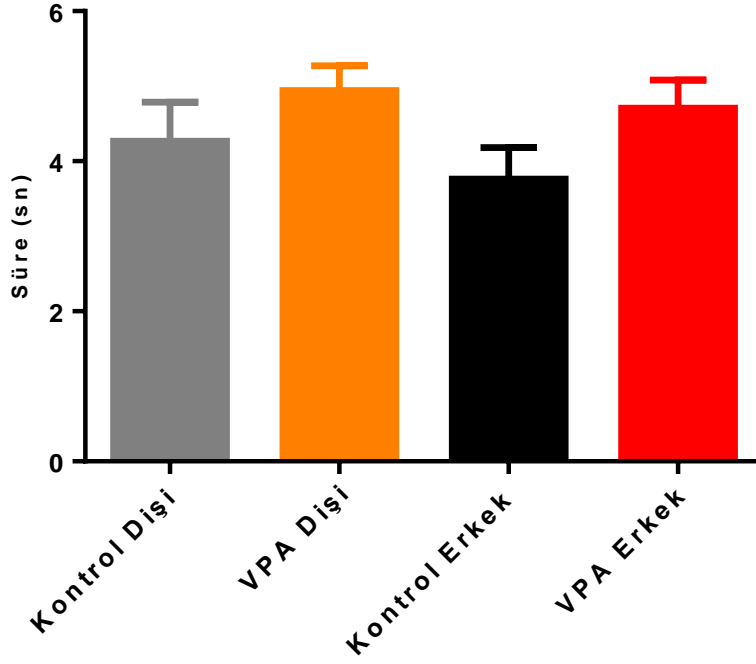
On dördüncü günde yapılan yürüme testini tamamlama süreleri bakımından gruplar arasında fark yoktu.



Şekil 4.4. Yürüme testi sürelerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA ve post hoc Tukey testi* uygulandı (Kontrol Dişi: $n=22$, VPA Dişi: $n=17$, Kontrol Erkek: $n=24$, VPA Erkek: $n=21$).

4.1.6. Negatif Geotaksi Testi Bulguları

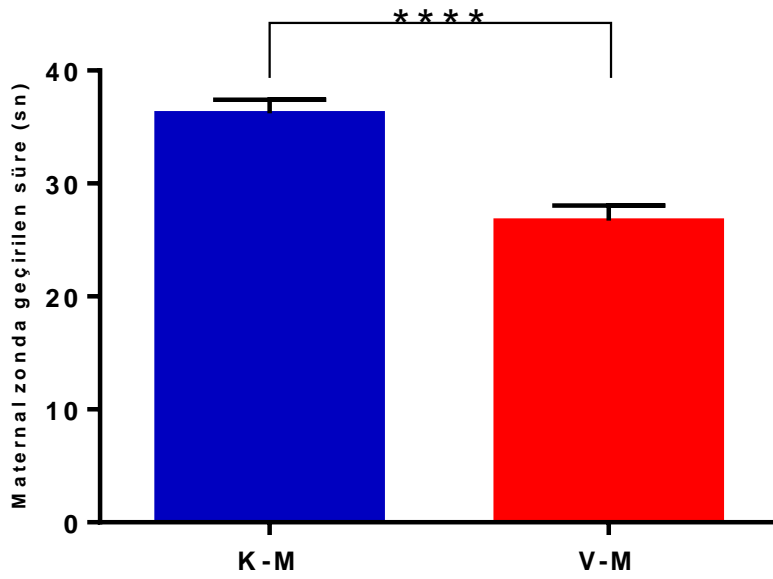
On beşinci günde yapılan negatif geotaksi testinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu.



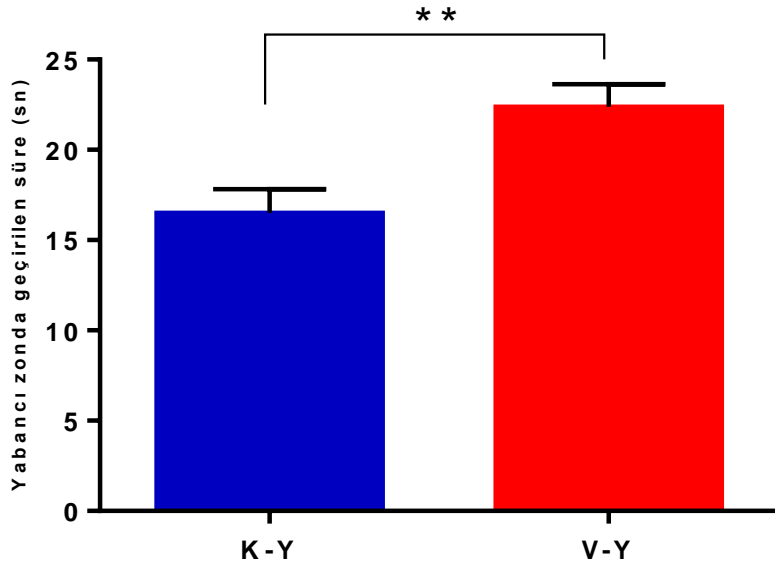
Şekil 4.5. Negatif Geotaksi testi sürelerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA ve post hoc Tukey testi uygulandı. (Kontrol Dişi: $n=15$, VPA Dişi: $n=18$, Kontrol Erkek: $n=17$, VPA Erkek: $n=24$).*

4.1.7. Anne Kokusu Tercih Testi Bulguları

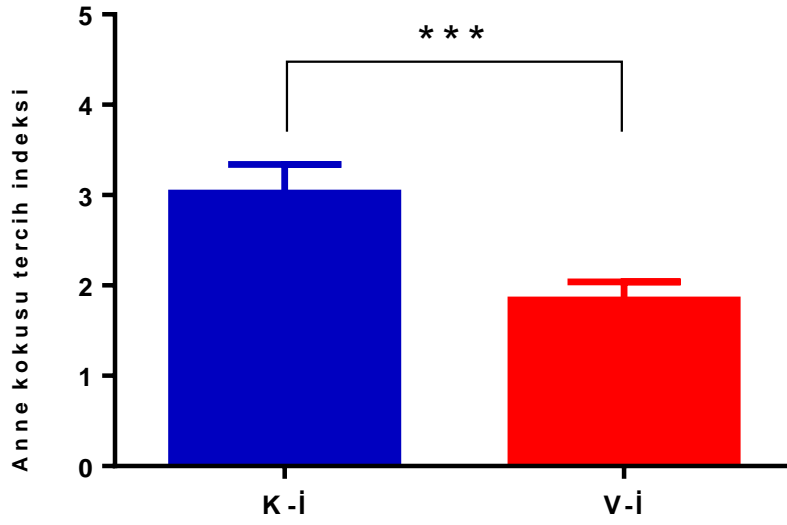
Her iki cinsiyetten yavruların dahil edildiği ölçümlerde; VPA grubu yavrularının kontrol grubu yavrularına göre maternal zonda daha az ($p<0,0001$; $t=4,948$), yabancı zonda ise daha fazla ($p=0,002$; $t=3,156$) vakit geçirdiği görüldü. Maternal zonda geçirilen süre, yabancı zonda geçirilen süreye oranlandığında kontrol grubunun anne kokusunu tercih etme indeksi VPA grubuna göre yüksek bulundu ($p=0,004$).



Şekil 4.6. Anne kokusu tercih testinde maternal zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. K-M: Kontrol grubu yavrularının maternal zonda geçirilen süreler, ($n=50$). V-M: VPA grubu yavrularının maternal zonda geçirilen süreler ($n=74$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı. **** $p<0,0001$.



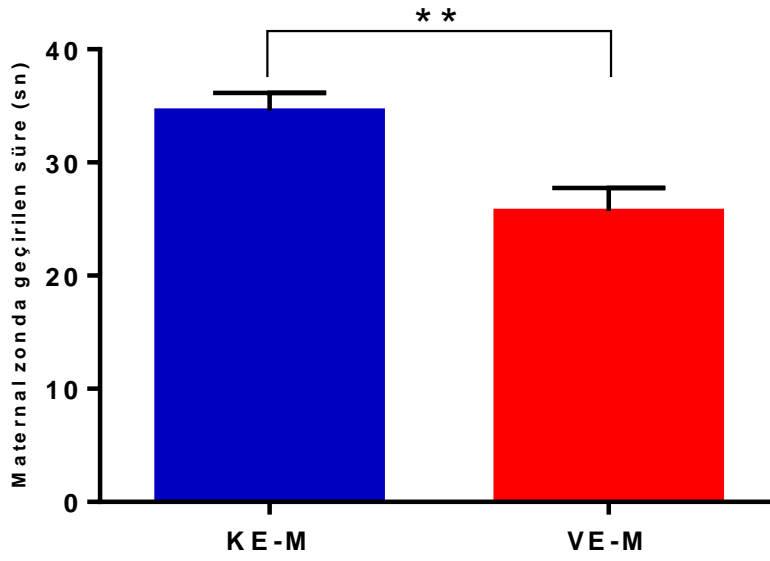
Şekil 4.7. Anne kokusu tercih testinde yabancı zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. K-Y: Kontrol grubu yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler, ($n=50$). V-Y: VPA grubu yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=74$). *Bağımsız örneklem t testi* uygulandı. $**p<0,01$.



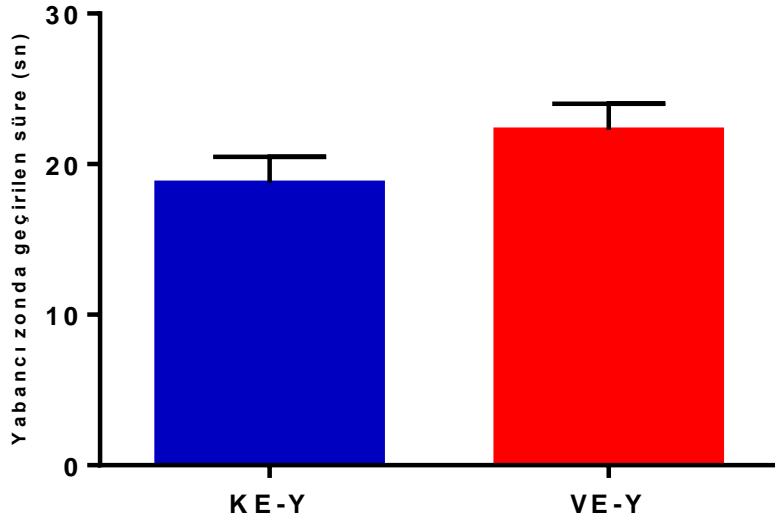
Şekil 4.8. Anne kokusu tercih testinde anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. K-İ= Kontrol grubu yavrularının maternal zonda geçirdiği sürenin yabancı zonda geçirdiği süreye oranı ($n=48$). V-İ= VPA grubu yavrularının maternal zonda geçirdiği sürenin yabancı zonda geçirdiği süreye oranı ($n=74$). *Mann-Whitney testi* kullanıldı. *** $p<0,001$.

4.1.7.1. Anne Kokusu Tercih Testi Erkek Yavruların Bulguları

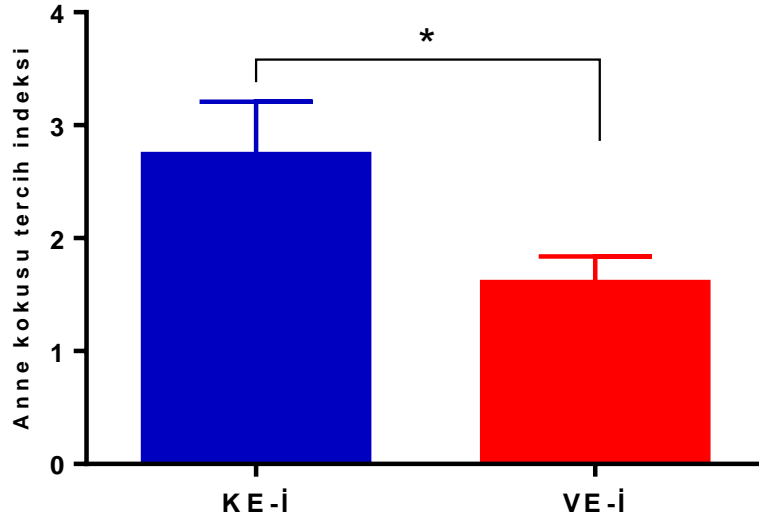
Kontrol ve VPA grubunda erkek yavruların anne kokusu tercih testi bulgularına bakıldığında; erkek VPA grubu yavrularının erkek kontrollere göre maternal zonda daha az ($p=0,002$; $t=3,212$) vakit geçirdiği görülürken yabancı zonda geçirilen sürelerin benzer olduğu görüldü. Maternal zonda geçirilen süre yabancı zonda geçirilen süreye oranlandığında, VPA grubu erkek yavruların anne kokusu tanıma indeksleri kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4.9. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KE-M: Kontrol grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=25$). VE-M: VPA grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=35$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı. ** $p<0,01$.



Şekil 4.10. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KE-Y: Kontrol grubu erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=25$). VE-Y: VPA grubu erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=35$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı.

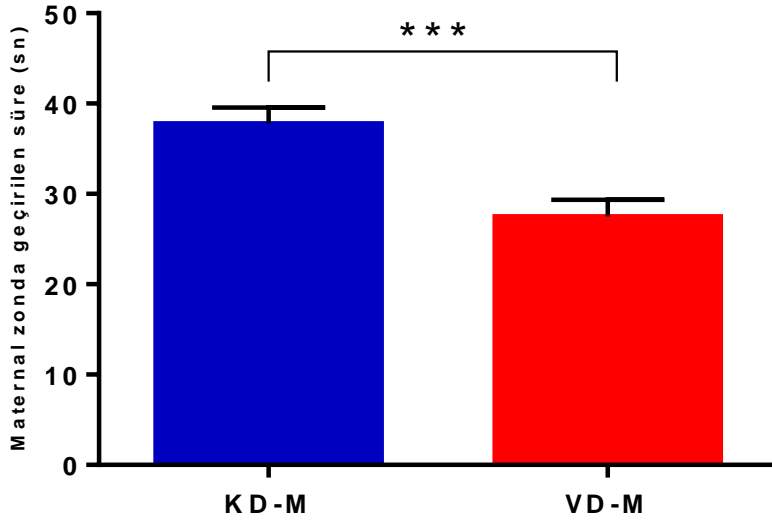


Şekil 4.11. Anne kokusu tercih testinde erkek yavruların anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. KE-İ: Kontrol grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirilen süreye oranları ($n=25$). VE-İ: VPA

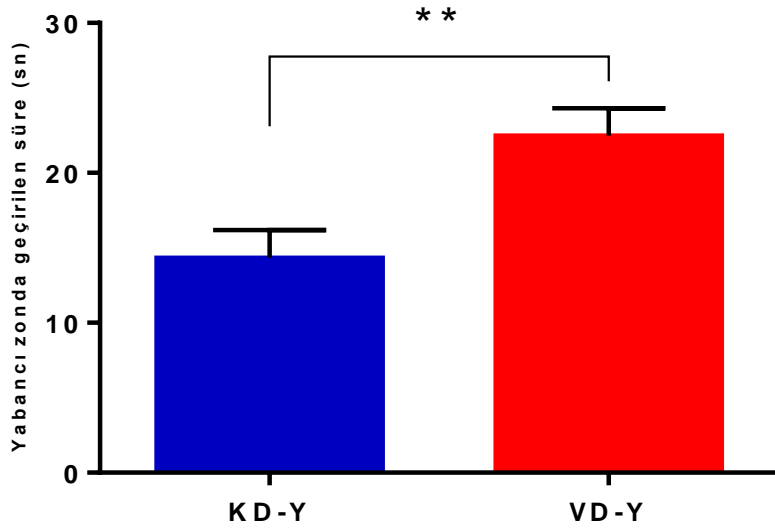
grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirilen süreye oranları ($n=27$). *Mann-Whitney testi* uygulandı. $*p<0,05$.

4.1.7.2. Anne Kokusu Tercih Testi Dişi Yavruların Bulguları

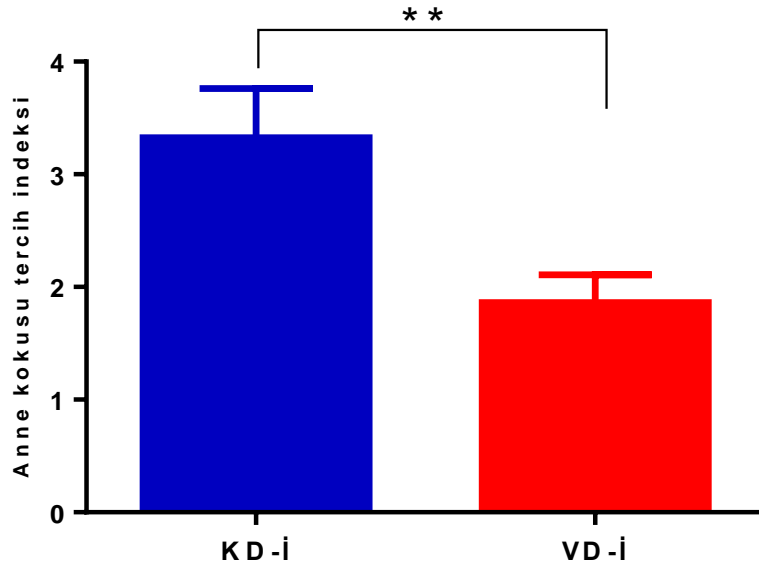
Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi yavrular kontrol grubu dişi yavrularına göre maternal zonda daha az ($p=0,0003$, $t=3,825$) vakit geçirirken yabancı zonda daha fazla ($p=0,0039$; $t=2,996$) vakit geçirdi. Dişi yavruların maternal zonda geçirdiği süreler yabancı zonda geçirdiği sürelerle oranlandığında, VPA grubu dişi yavrularının anne kokusu tercih indeksleri kontrol grubuna göre daha düşük bulundu ($p=0,006$).



Şekil 4.12. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KD-M: Kontrol grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=25$). VD-M: VPA grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=39$). *Bağımsız örneklem t testi* uygulandı. $***p<0,001$.



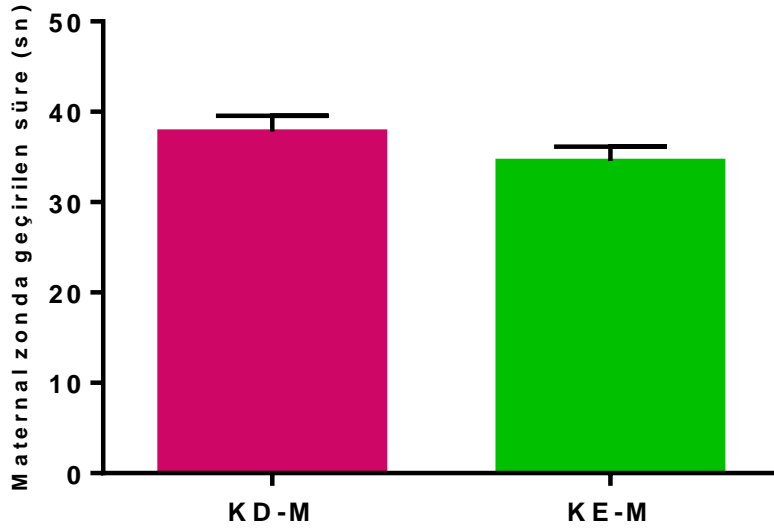
Şekil 4.13. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KD-Y: Kontrol grubu dişi yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=25$). VD-Y: VPA grubu dişi yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=39$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı. $**p<0,01$.



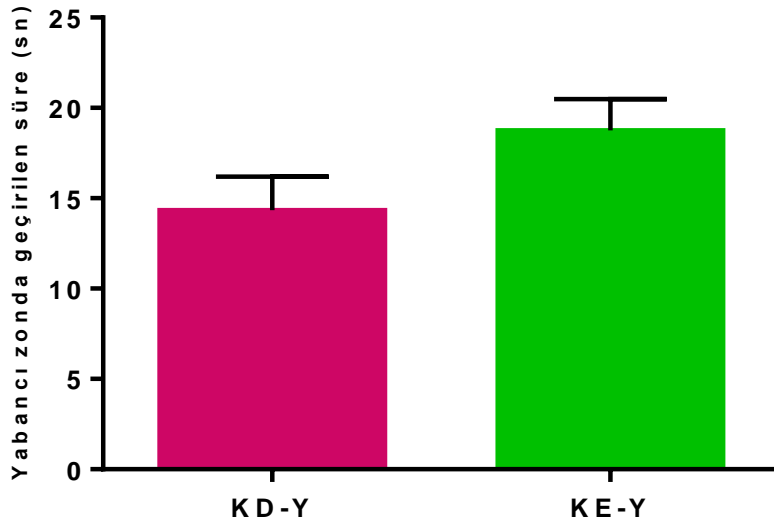
Şekil 4.14. Anne kokusu tercih testinde dişi yavruların anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. KD-İ: Kontrol grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirdiği sürelerle oranı ($n=23$). VD-İ: VPA grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirdiği sürelerle oranı ($n=39$). Mann-Whitney testi uygulandı. $**p<0,01$.

4.1.7.3. Anne Kokusu Tercih Testi Kontrol Grubu Bulgularında Cinsiyetin Etkisi

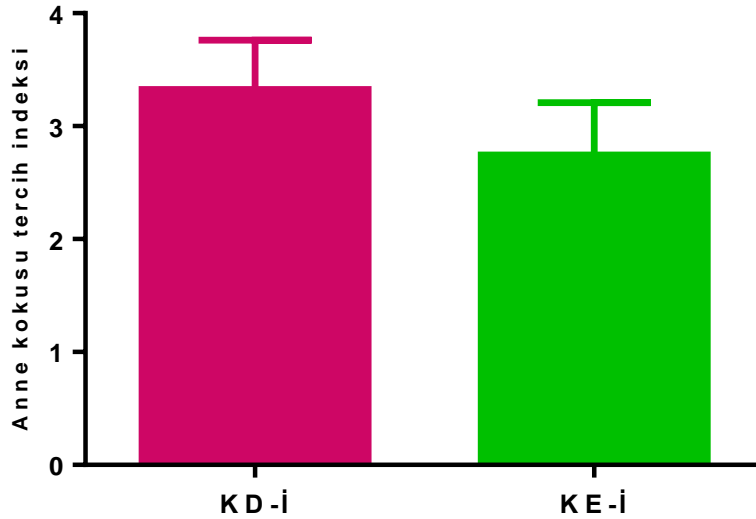
Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek sıçanları arasında maternal zonda geçirilen süreler, yabancı zonda geçirilen süreler ve maternal zonda geçirilen sürenin yabancı zonda geçirilen süreye oranı ile elde edilen anne kokusu tercih indeksleri arasında fark bulunmadı.



Şekil 4.15. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KD-M: Kontrol grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=25$). KE-M: Kontrol grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=25$). *Bağımsız örneklem t testi* uygulandı.



Şekil 4.16. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. KD-Y: Kontrol grubu dişi yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=25$). KE-Y: Kontrol grubu erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=25$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı.

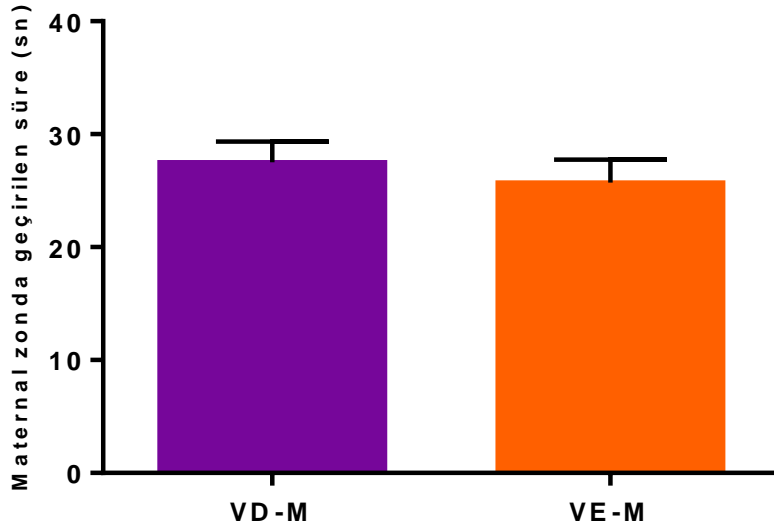


Şekil 4.17. Anne kokusu tercih testinde kontrol grubu dişi ve erkek yavrularının anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. KD-İ: Kontrol grubu dişi yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirdiği süreye oranları

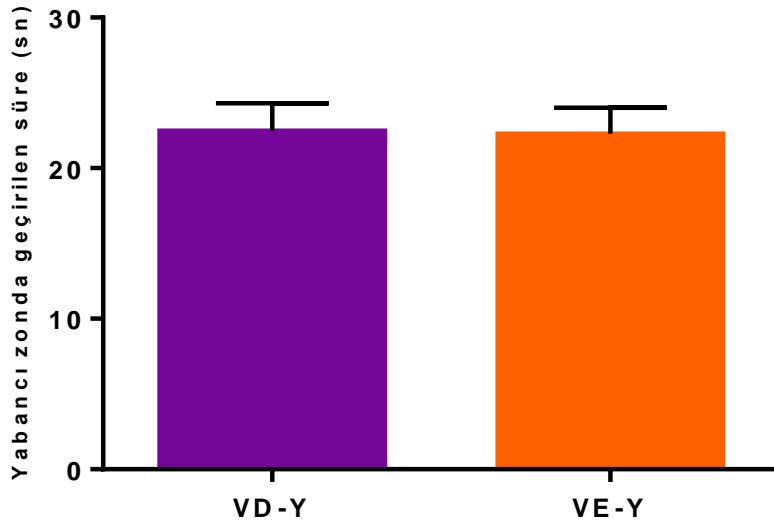
($n=23$). KE-İ: Kontrol grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirdiği süreye oranları ($n=25$). *Mann-Whitney testi* uygulandı.

4.1.7.4. Anne Kokusu Tercih Testi VPA Grubu Bulgularında Cinsiyetin Etkisi

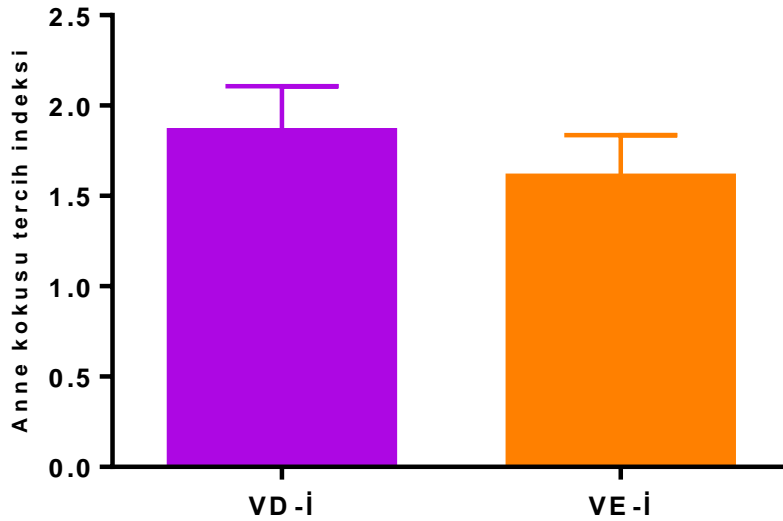
Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek sıçanları arasında maternal zonda geçirilen süreler, yabancı zonda geçirilen süreler ve maternal zonda geçirilen sürenin yabancı zonda geçirilen süreye oranı ile elde edilen anne kokusu tercih indeksleri arasında fark bulunmadı.



Şekil 4.18. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. VD-M: VPA grubu dişi yavruların maternal zonda geçirdiği süreler ($n=39$). VE-M: VPA grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği süreler ($n=35$). *Bağımsız örneklem t testi* uygulandı.



Şekil 4.19. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği sürelerin karşılaştırılması. VD-Y: VPA grubu dişi yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=39$). VE-Y: VPA grubu erkek yavrularının yabancı zonda geçirdiği süreler ($n=35$). Bağımsız örneklem t testi uygulandı.



Şekil 4.20. Anne kokusu tercih testinde VPA grubu dişi ve erkek yavrularının anne kokusu tercih indekslerinin karşılaştırılması. VD-İ: VPA grubu dişi yavruların maternal zonda geçirdiği sürelerin yabancı zonda geçirdiği süreye oranları ($n=39$). VE-

İ: VPA grubu erkek yavrularının maternal zonda geçirdiği sürenin yabancı zonda geçirdiği süreye oranları ($n=27$). *Mann-Whitney testi* uygulandı.

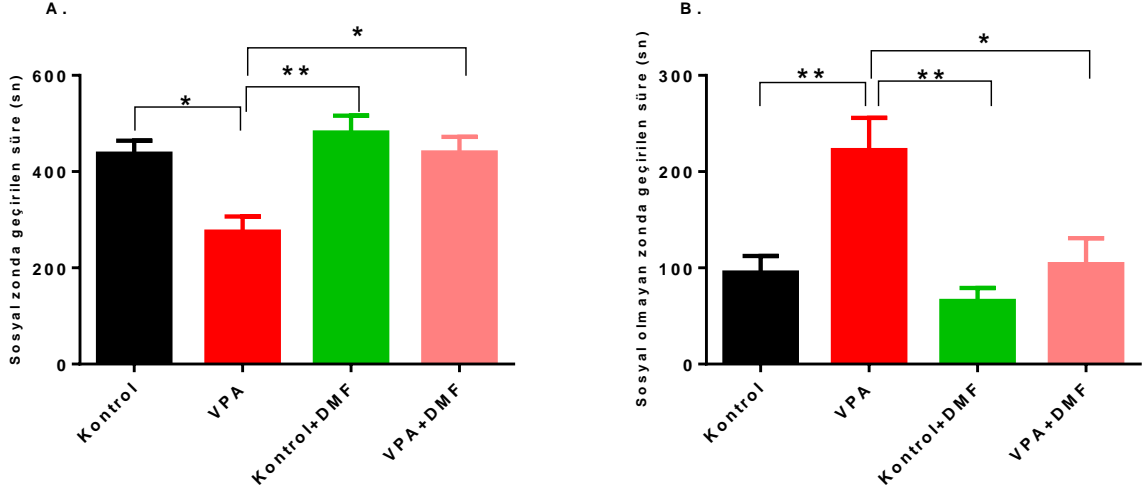
4.2. Davranış Deneyleri Bulguları

4.2.1. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi Bulguları

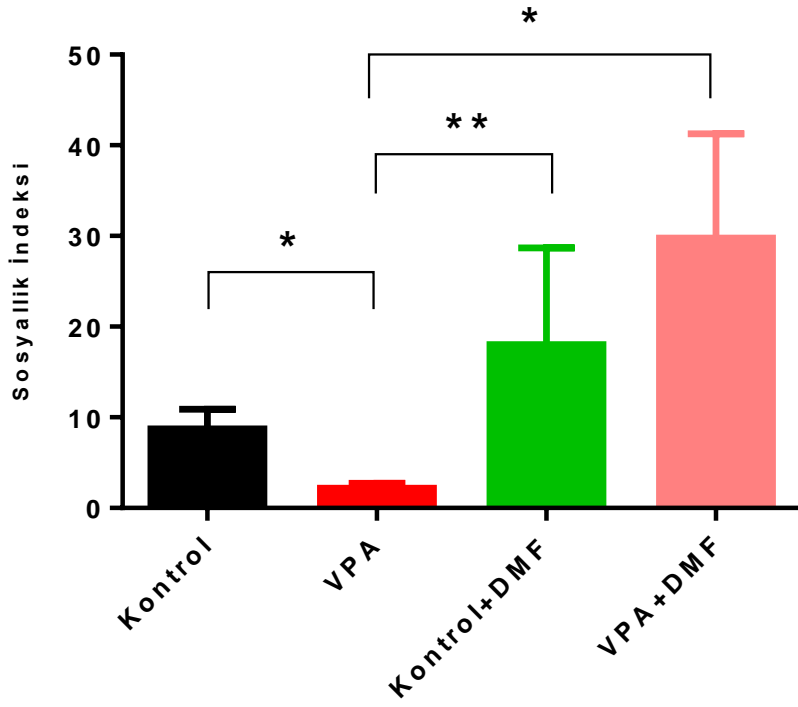
Üç odacıklı sosyal etkileşim testinde; sosyal zonda geçirilen süre, sosyal olmayan zonda geçirilen süre ve sosyal zonda geçirilen sürenin sosyal olmayan zonda geçirilen süreye oranını ifade eden sosyallik indeksi parametreleri üzerinden deney hayvanlarının benzer yaş, tür ve cinsiyetteki başka bir hayvanla sosyal etkileşimi değerlendirildi.

Sosyal zonda ($p<0,001$) ve sosyal olmayan zonda $\{F(3,47)=6,914; p<0,001\}$ geçirilen süreler ve sosyallik indeksleri ($p<0,01$) karşılaştırıldığında gruplar arasında fark görüldü. VPA grubu hayvanları; sosyal zonda kontrol grubuna göre daha az vakit geçirirken ($p=0,01$) sosyal olmayan zonda kontrol grubu hayvanlarına göre daha fazla vakit geçirdi ($p=0,003$). VPA+DMF grubunda, sosyal zonda geçirilen süre VPA grubu hayvanlarına göre fazla bulunurken ($p=0,02$) sosyal olmayan zonda geçirilen süre, VPA grubundan düşüktü ($p=0,01$). Kontrol+DMF grubunda sosyal ve sosyal olmayan zonda geçirilen süreler kontrol grubuna benzerdi, sosyal zonda geçirilen süre VPA grubuna göre yüksek bulunurken ($p=0,003$) sosyal olmayan zonda geçirilen sürelerin de VPA grubuna göre düşük olduğu görüldü ($p=0,002$). Kontrol+DMF ve VPA+DMF grupları arasında sosyal ve sosyal olmayan zonda geçirilen süreler bakımından fark yoktu.

VPA grubu sosyallik indeksi değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ($p=0,015$). VPA+DMF grubu ($p=0,02$) ve Kontrol+DMF grubu ($p=0,004$) sosyallik indeksi değerleri kontrol grubu ile benzer ve VPA grubuna göre yüksekti.



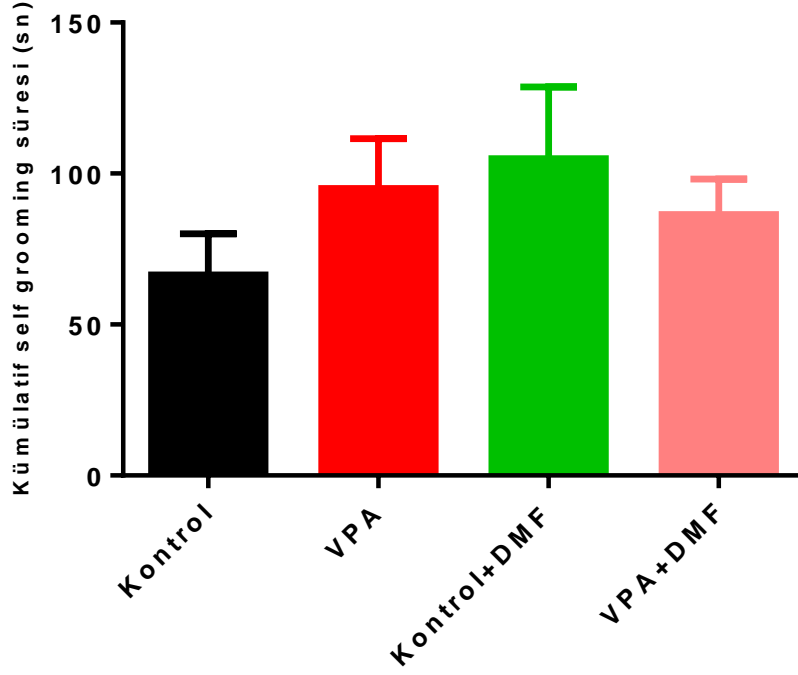
Şekil 4.21. Üç odacıklı sosyal etkileşim testinde sosyal ve sosyal olmayan zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. A. Sosyal zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması. B. Sosyal Olmayan zonda geçirilen sürelerin karşılaştırılması (Kontrol:n=15, VPA:n=15, Kontrol+DMF:n=8, VPA+DMF:n=13). Tek yönlü ANOVA testi ve *post hoc* Tukey testi uygulandı. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.



Şekil 4.22. Üç odacıklı sosyal etkileşim testinde sosyallik indekslerinin karşılaştırılması. Kruskal-Wallis testi ve *post hoc* Dunn's testi uygulandı (Kontrol: $n=15$, VPA: $n=15$, Kontrol+DMF: $n=8$, VPA+DMF: $n=13$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

4.2.2. Grooming Testi Bulguları

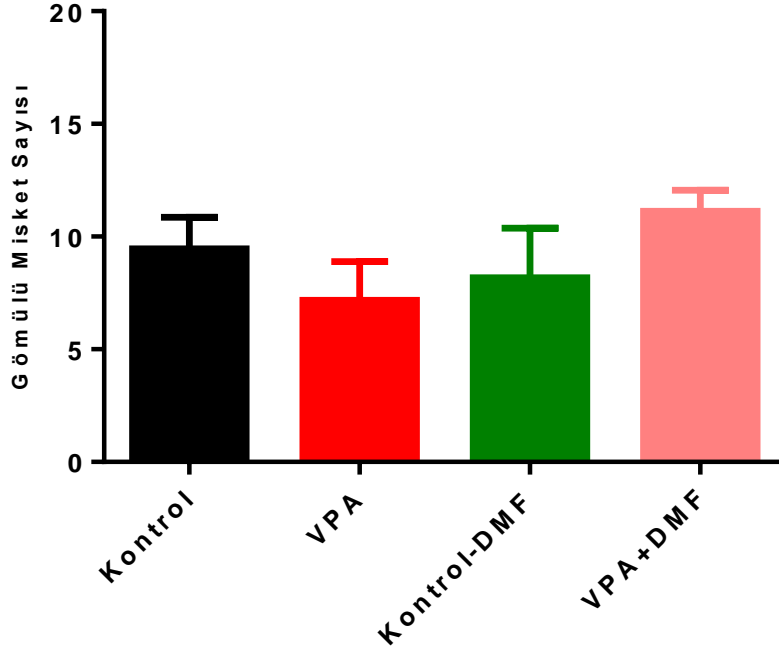
Stereotipik ve obsesif kompulsif davranış paternini değerlendirmek için yapılan grooming testinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.23. Kümülatif grooming sürelerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi* uygulandı (Kontrol: $n=13$, VPA: $n=16$, Kontrol+DMF: $n=6$, VPA+DMF: $n=8$).

4.2.3. Misket Gömme Testi Bulguları

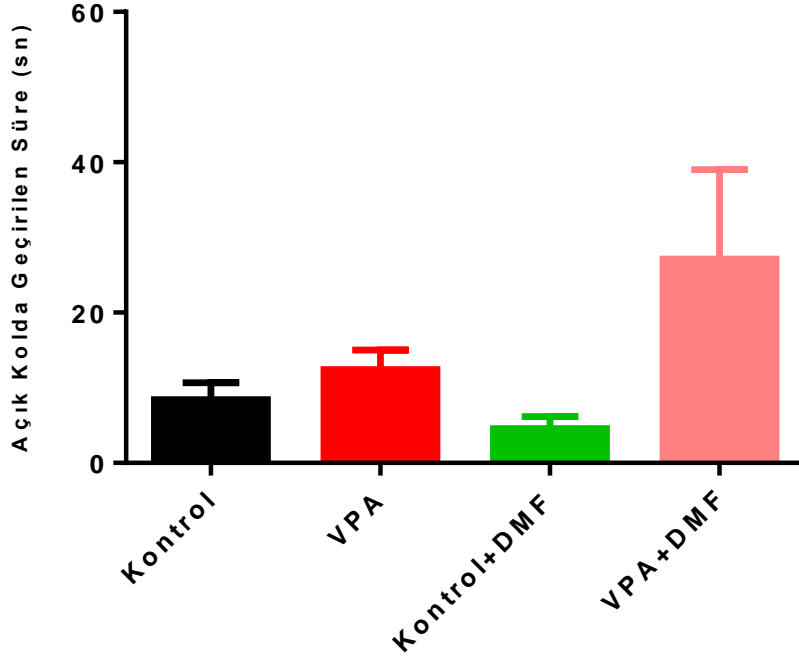
Kompulsif benzeri davranış paterni değerlendirmesi için yapılan misket gömme testinde gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.



Şekil 4.24. Misket gömme testinde toplam gömülü misket sayılarının karşılaştırılması. Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulandı (Kontrol: $n=13$, VPA: $n=11$, Kontrol+DMF: $n=6$, VPA+DMF: $n=8$).

4.2.4. Yükseltmiş Artı Testi Bulguları

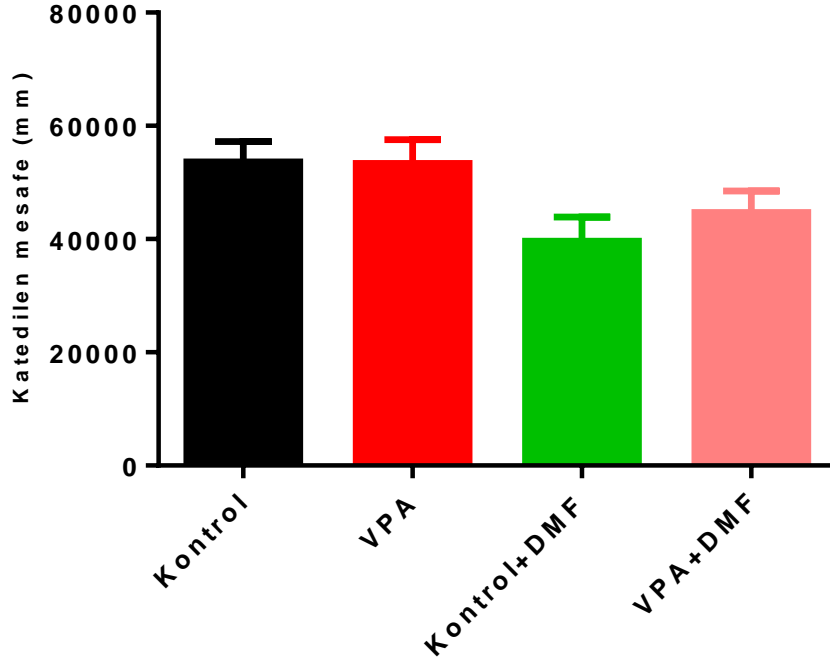
Anksiyete değerlendirmek için yapılan yükseltmiş artı testinde açık kolda geçirilen toplam süreler bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.



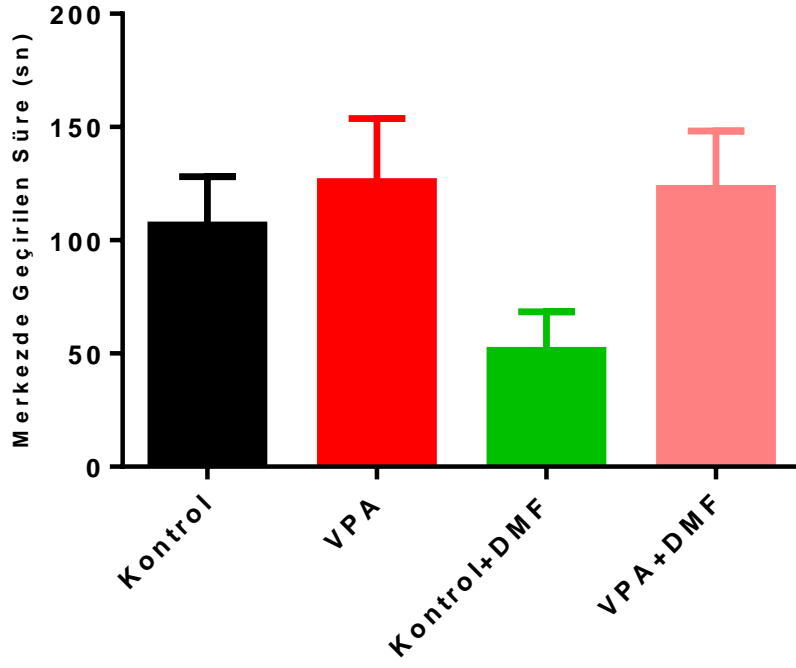
Şekil 4.25. Yükseltmiş artı testinde açık kolda geçirilen toplam sürelerin karşılaştırılması. *Kruskal-Wallis testi* ve *post hoc Dunn testi* uygulandı (Kontrol: $n=18$, VPA: $n=19$, Kontrol+DMF: $n=14$, VPA+DMF: $n=9$).

4.2.5. Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan testinde; lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için ölçülen katedilen mesafe ve anksiyete düzeyini değerlendirmek için ölçülen merkezde geçirilen süre bakımından gruplar arasında fark bulunmadı.



Şekil 4.26. Açık alan testinde toplam katedilen mesafelerin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi* uygulandı (Kontrol: $n=20$, VPA: $n=24$, Kontrol+DMF: $n=13$, VPA+DMF: $n=14$).



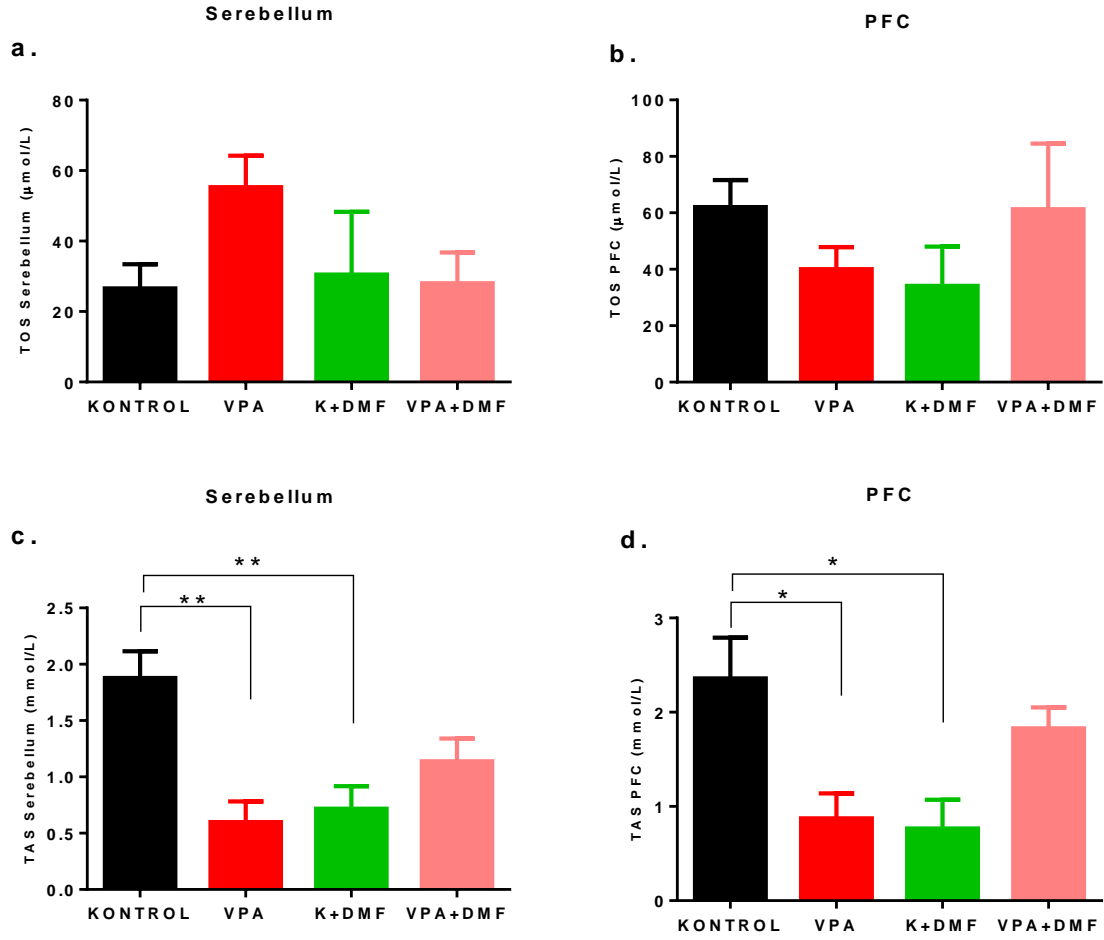
Şekil 4.27. Açık alan testinde merkezde geçirilen sürelerin karşılaştırılması. Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulandı (Kontrol:n=19, VPA:n=23, Kontrol+DMF:n=13, VPA+DMF:n=13).

4.3. Serebellum ve PFC Dokularında TAS, TOS ve OSİ Bulguları

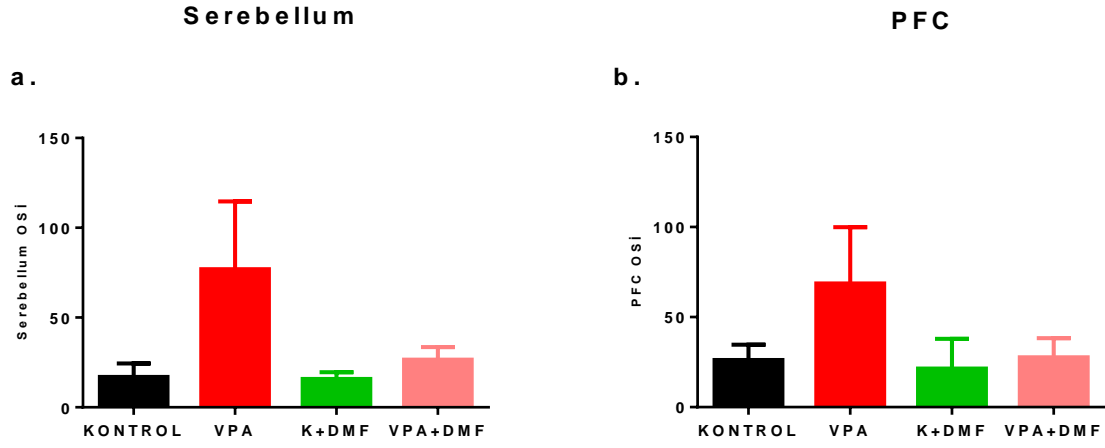
Serebellumda yapılan TOS ölçümlerinde *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi* sonucu gruplar arasında istatistiksel anlamlılığa yetecek düzeyde fark yoktu ($p=0,2$). Ancak VPA grubunda TOS'un kontrole göre artma eğiliminde olduğu görülüp *Bağımsız örneklem t testi* yapıldığında VPA grubunda oksidatif stresin anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p=0,04$; $t=2,56$). Aynı şekilde VPA+DMF grubunda DMF'in TOS'u azaltma eğiliminde olduğu görülüp VPA ve VPA+DMF grubu TOS değerleri için *Bağımsız örneklem t testi* uygulandığında istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da bir eğilim olduğu gösterildi ($p=0,06$; $t=2,163$). Prefrontal kortekste TOS değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Serebellumda $\{F(3,13)=7,314$; $p=0,004\}$ ve prefrontal kortekste $\{F(3,12)=5,772$; $p=0,011\}$ yapılan TAS ölçümlerinde gruplar arasında fark bulundu. VPA grubunda kontrole göre antioksidan yanıtın düşük olduğu görüldü ($p=0,004$). VPA+DMF grubu TAS değerleri ile kontrol grubu TAS değerleri benzerdi. DMF uygulamasının Kontrol+DMF grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde TAS'ı azalttığı görüldü ($p=0,009$). Serebellumla benzer şekilde prefrontal kortekste de VPA grubunda kontrole göre antioksidan yanıt azaldı ($p=0,01$). VPA+DMF grubu TAS değerleri ile kontrol grubu TAS değerleri arasında fark yoktu. Kontrol+DMF grubunda kontrole göre TAS düşük bulundu ($p=0,02$).

Oksidan durumun antioksidan duruma oranı (TOS/TAS) ile hesaplanan oksidatif stres indeksleri (OSİ) bakımından gruplar arasında fark yoktu. Fakat hem serebellumda hem de prefrontal kortekste VPA grubunda, kontrole göre OSİ'nin artma eğiliminde olup DMF uygulaması sonucu VPA+DMF ve Kontrol+DMF gruplarında azalma eğiliminde olması şeklindeki benzer paternler dikkat çekmektedir.



Şekil 4.28. Serebellum ve PFC’de total oksidan status (TOS) ve total antioksidan status (TAS) ölçümlerinin karşılaştırılması. a. Serebellumda TOS ölçümlerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=4-5)* b. Prefrontal kortekste TOS ölçümlerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=2-5)*. c. Serebellumda TAS ölçümlerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=4-5)*. d. Prefrontal kortekste TAS ölçümlerinin karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=3-5) *p<0,05, **p<0,01.*



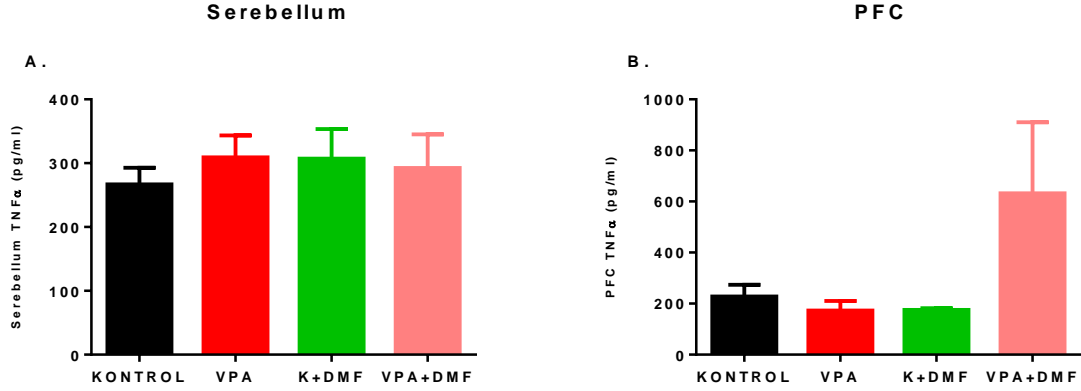
Şekil 4.29. Serebellum ve PFC’de oksidatif stres indekslerinin karşılaştırılması.

a. Serebellum oksidatif stres indekslerinin (OSİ) karşılaştırılması. *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=3-5).* **b. Prefrontal korteks OSİ değerlerinin karşılaştırılması.** *Tek yönlü ANOVA testi ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır (n=2-5).*

4.4. Serebellum ve PFC Dokularında ELISA Bulguları

4.4.1. TNF α ELISA Bulguları

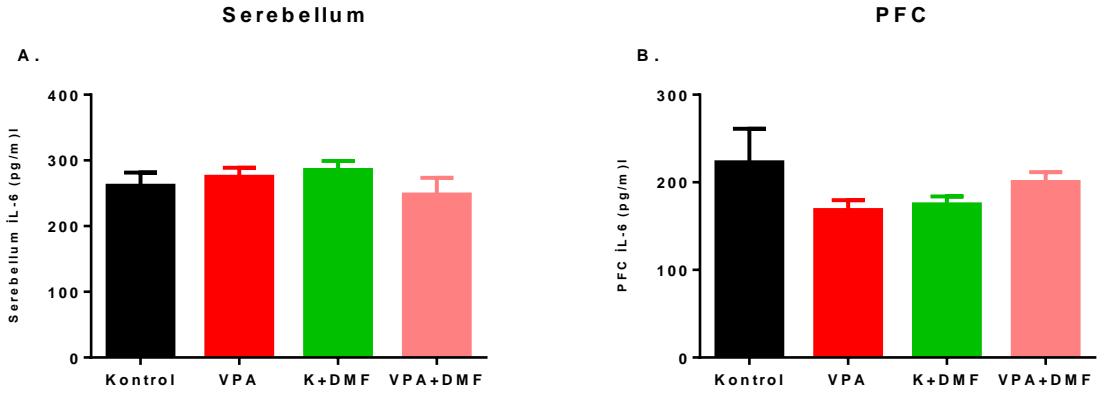
Serebellum ve PFC'de TNF α düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.30. Serebellum ve PFC'de TNF α düzeylerinin karşılaştırılması. A. Serebellum TNF alfa düzeyleri. Tek yönlü ANOVA ve *post-hoc* Tukey testi uygulandı ($n=2-5$). B. Prefrontal korteks TNF alfa düzeyleri. Tek yönlü ANOVA testi ve *post-hoc* Tukey testi uygulandı ($n=2-4$).

4.4.2. İL-6 ELISA Bulguları

Serebellumda ve prefrontal kortekste İL-6 düzeyleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı.

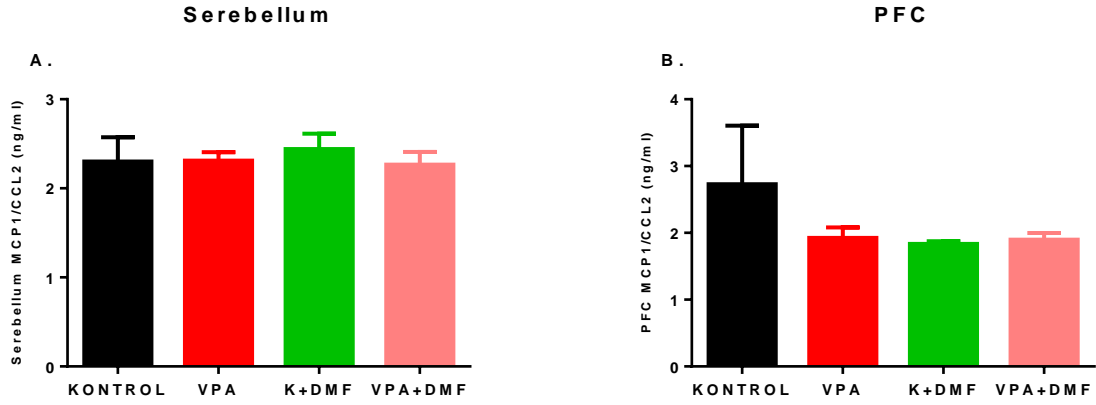


Şekil 4.31. Serebellum ve PFC’de İL-6 düzeylerinin karşılaştırılması.

A. Serebellum İL-6 düzeyleri. *Kruskal-Wallis testi* ve *post-hoc Dunn’s testi* uygulandı ($n=5$). **B. Prefrontal korteks İL-6 düzeyleri.** *Tek yönlü ANOVA testi* ve *post-hoc Tukey testi* uygulandı ($n=5$).

4.4.3. MCP1/CCL2 ELISA Bulguları

Serebellumda ve prefrontal kortekste MCP1/CCL2 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

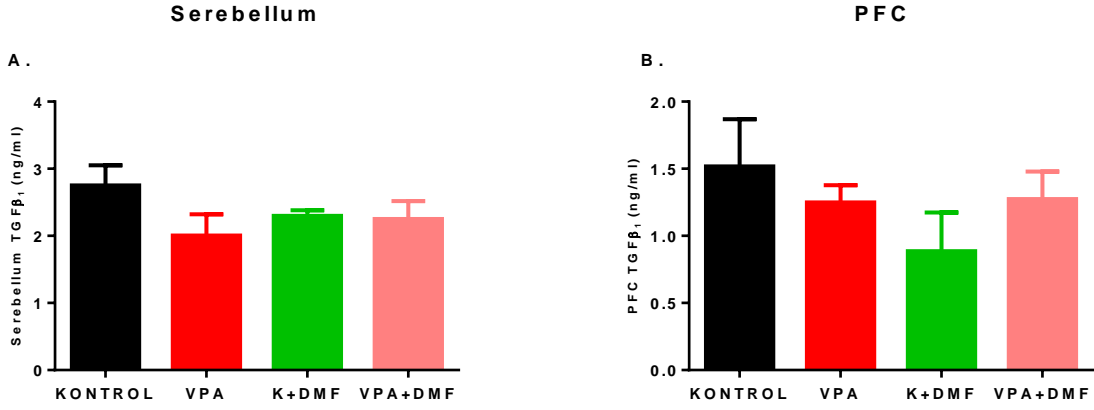


Şekil 4.32. Serebellum ve PFC'de MCP1/CCL2 düzeylerinin karşılaştırılması.

A. Serebellum MCP1/CCL2 düzeyleri. Tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=5$). **B. Prefrontal korteks MCP1/CCL2 düzeyleri.** Kruskal-Wallis testi ve Dunn's testi uygulandı ($n=4-5$).

4.4.4. TGF β_1 ELISA Bulguları

Serebellum ve PFC'de TGF β_1 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

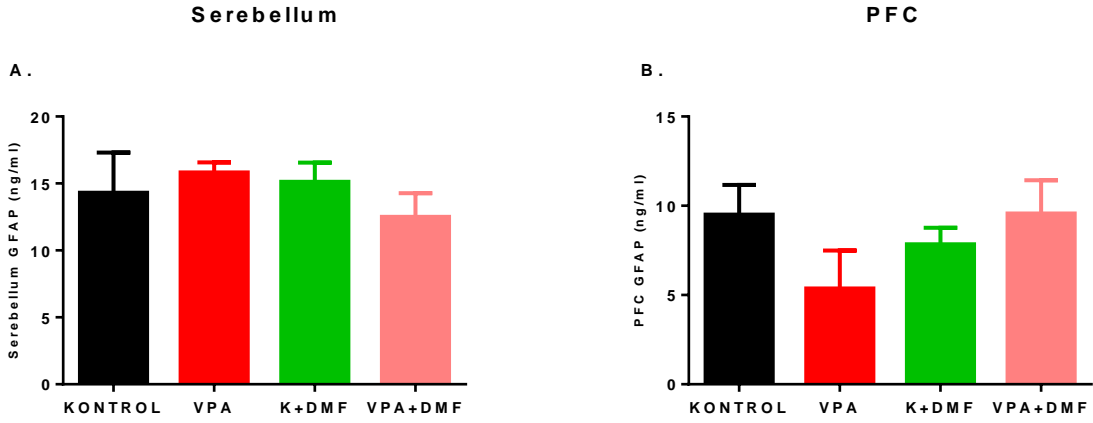


Şekil 4.33. Serebellum ve PFC'de TGF β_1 düzeylerinin karşılaştırılması.

A. Serebellum TGF β_1 düzeyleri. Tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=5$) **B. Prefrontal korteks TGF β_1 düzeyleri.** Tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi uygulandı ($n=3-5$).

4.4.5. GFAP ELISA Bulguları

Serebellumda ve prefrontal kortekste GFAP düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.34. Serebellum ve PFC'de GFAP düzeylerinin karşılaştırılması. A. Serebellum GFAP düzeyleri. Tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi uygulandı (n=5). B. Prefrontal korteks GFAP düzeyleri. Tek yönlü ANOVA testi ve post-hoc Tukey testi uygulandı (n=4-5).

5. TARTIŞMA

5.1. Prenatal VPA Maruziyetinin Fiziksel Gelişim ve Sensorimotor Beceriler Üzerine Etkisi

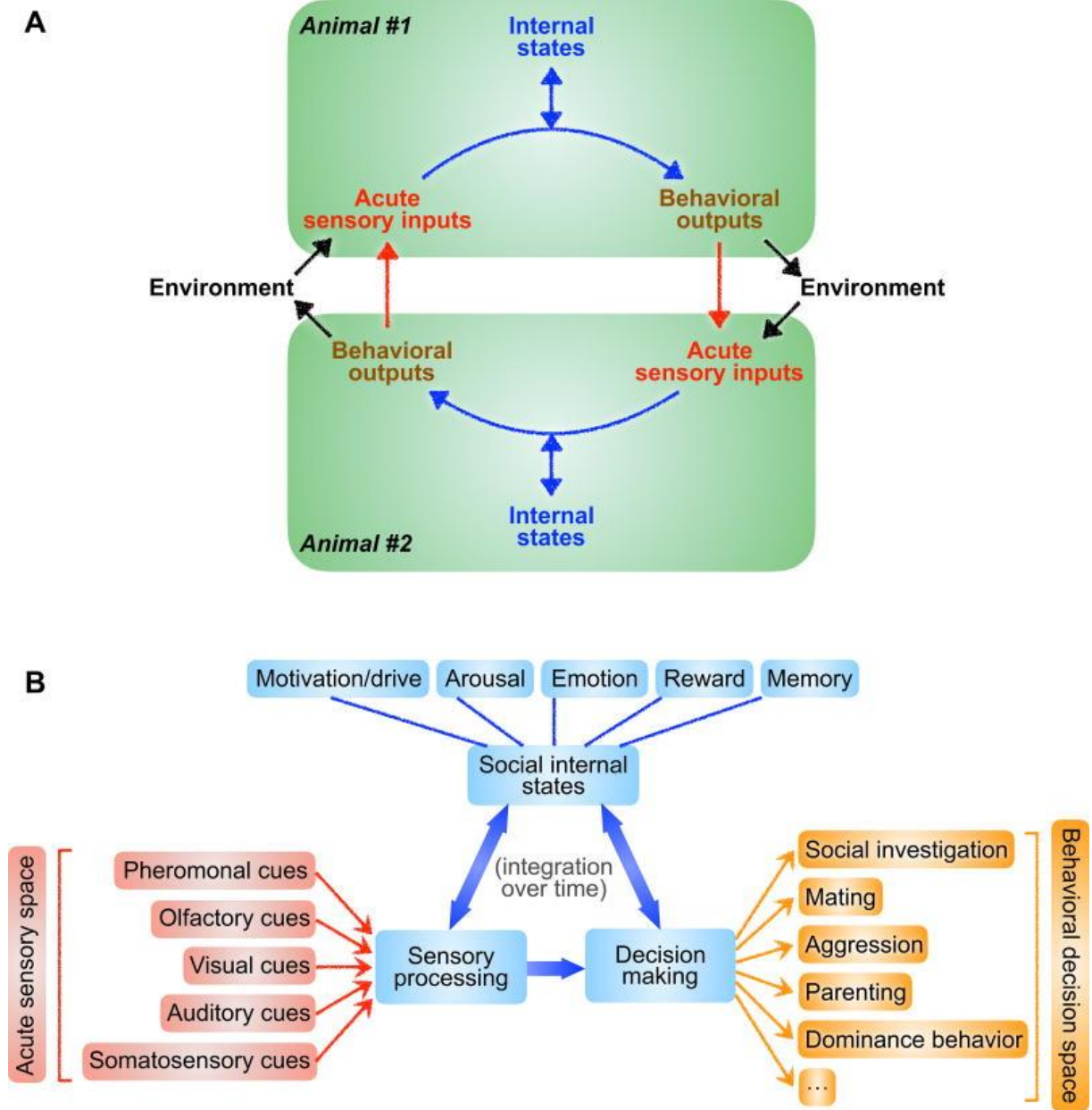
Çalışmamızda VPA grubu ve kontrol grubunda aynı cinsiyetteki yavrular arasında vücut ağırlığı ve boy uzunluğu değerleri bakımından fark görülmedi. Başka bir çalışmada bulgularımızla uyumlu şekilde VPA ile indüklenen OSB modelinde prenatal (12.5, 14 ve 21. günler) ve postnatal (33. haftaya kadar) yapılan vücut ağırlığı takibinde hem dişi hem erkek yavrularda kontrole göre fark görülmemiştir [210]. Ancak prenatal VPA maruziyeti olan yavrularda 6 ay boyunca vücut ağırlığı takibi yapılan bir diğer çalışmada postnatal 23. günden itibaren VPA grubu vücut ağırlığının kontrole göre düşük olduğu bildirilmiştir [211]. Literatürde VPA ile indüklenen OSB modelinde fiziksel gelişim parametreleri ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. OSB'li bireylerde erken adölesan dönemde boy uzunluğu ve vücut ağırlığının kontrole göre değişmediği gösterilmiştir [212], çalışmamızdaki bulgular insan verileriyle de uyumludur.

OSB'li infant ve çocukların motor gelişimlerinin değerlendirildiği birçok çalışmada tutarlı bir biçimde kaba ve ince motor becerilerde gerilik olduğu bildirilmiştir [213-218] Çalışmamızda; doğrulma refleksinin VPA grubu dişilerinde, kontrol grubu dişi ve erkeklerine göre daha geç kazanıldığı görüldü. Bu durum VPA ile indüklenen OSB modelinde dişilerde motor becerilerin kontrole göre geri olduğunu göstermektedir. Ancak VPA grubu erkeklerinde kontrole göre fark görülmedi. Prenatal VPA maruziyeti, doğrulma refleksinin dışındaki nörogelişimsel reflekslerin kazanılması ve göz açılması bakımından gecikmeye neden olmadı. Belirli günlerde yapılan ve nörogelişimsel reflekslerin değerlendirildiği negatif geotaksi, yürüme ve doğrulma testlerini tamamlama süreleri bakımından gruplar arasında fark bulunmadı. Literatürde VPA ile indüklenen OSB modelinde, nörogelişimsel refleks testlerinde OSB modeli grubu bulgularının kontrole benzer olduğu görülen çalışmalar da mevcuttur [211,219,220]. Prenatal VPA maruziyetinin fiziksel ve sensorimotor gelişime etkisinin araştırıldığı bir çalışmada dişi ve erkek sıçanların gelişimsel gidişatının VPA maruziyeti sonucu farklı etkilendiği bildirilmiştir [219]. Prenatal VPA maruziyeti olan dişi hayvan bulgularımız OSB'li bireylerde görülen motor becerilerde gelişim geriliğini yansıtacak şekilde insan

verileriyle uyumludur. Prenatal VPA maruziyeti motor beceriler bakımından cinsiyete bağımlı değişiklik gösteriyor olabilir. Bulgularımıza göre VPA ile indüklenen OSB modeli dişilerde OSB'ye eşlik eden motor becerilerde bozulmayı araştırmak için uygun bir modeldir.

5.2. Dimetil Fumaratın Sosyal Etkileşim Bozukluğu Üzerine Etkisi ve İlgili Mekanizmalar

Sosyal davranışlar, iki türdeş canlı arasındaki herhangi bir iletişim ve/veya etkileşim yöntemi olarak tanımlanabilir ve tek hücreli mikroorganizmalardan insanlar kadar kompleks türlere kadar gözlenmektedir [221,222]. Rekabete dayalı veya işbirlikçi sosyal davranışlar; türün sağlığı, hayatta kalması ve üreyebilmesi için gereklidir. Sosyal etkileşimler; feromonal, olfaktör, görsel, işitsel ve somatosensöriyel duylardan gelen girdilerin algılanıp işlenmesi ve bireyin duygudurumu, deneyimleri gibi içsel faktörleri de içeren tüm bileşenler arasındaki dinamik, karşılıklı geri bildirim dayalı davranışların oluşturulmasıyla anlık olarak şekillendirilmektedir (Bkz. Şekil 5.1). Uygunsuz zaman ve ortamda ya da uygunsuz yoğunlukta sergilenen sosyal davranışlar, hem bireyler hem de bireyin dahil olduğu sosyal grup üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir [223]. Sosyal işlevlerdeki patolojinin en belirgin olduğu nörogelişimsel bozuklardan biri otizm spektrum bozukluğudur [4].



Şekil 5.1. Duyusal girdilerin sosyal bağlamlarda sosyal davranışsal kararlara dönüştürülmesi-Chen ve ark. [223]'dan alınmıştır.

Çalışmamızda; VPA ile indüklenen OSB modelinde sosyal keşif davranışının değerlendirilmesi için 3 odacıklı sosyal etkileşim testi kullanıldı [202]. VPA grubunda sosyal zonda geçirilen sürenin ve sosyallik indeksinin kontrole göre azaldığı görüldü. Prenatal VPA maruziyetinin hem bu çalışmada kullanılan SD türü sıçanlarda ve 400 mg/kg dozunda hem de farklı türlerde ve dozlarda deney hayvanlarında sosyal etkileşimi bozduğu gösterilmiştir [194,203,211].

OSB tedavisinde umut vadeden bir bulgu olarak olarak sıçanlarda adölesan dönemden başlanarak (30. gün) 5 hafta boyunca oral DMF uygulaması, VPA grubundaki sosyal etkileşim bozukluğunu geri döndürdü. VPA+DMF grubu ile kontrol grubu arasında sosyal zonda geçirilen süre ve sosyallik indeksi bakımından fark görülmedi. **Dimetil fumaratın sosyal etkileşim bozukluğu üzerindeki terapötik etkisi ilk defa çalışmamızda gösterildi.**

Hipotezlerimizde yer alan DMF'in OSB fenotipindeki olası terapötik etki mekanizmasını açıklamaya yönelik yapılan kolorimetrik ölçüm ve ELISA bulguları incelendiğinde TAS, TOS ve OSİ değerleri dikkat çekmektedir. VPA grubunda hem serebellum hem de PFC'de TAS'ın azaldığı ve DMF uygulamasının prenatal VPA maruziyeti olan hayvanlarda TAS'ı yükselterek kontrole benzer değerlere getirdiği görüldü. Literatürde OSB'li bireylerde antioksidan uygulamalarının OSB semptomlarını iyileştirdiği gösterilmiştir [224]. Aynı zamanda VPA ile indüklenen OSB modelinde de astaxanthin, resveratrol gibi antioksidanların sosyal eksiklikleri iyileştirdiği gösterilmiştir [168,225]. Ancak bu konudaki çalışmalar sınırlıdır ve sonuçları oldukça heterojendir. **Dimetil fumarat OSB'deki yetersiz antioksidan yanıtı güçlendirerek sosyal etkileşim bozukluğunu iyileştiriyor olabilir.** İlginç bir bulgu olarak DMF uygulaması hem serebellum hem de PFC'de VPA grubunda TAS'ı artırırken Kontrol+DMF grubunda azalttı.

Henüz çok sınırlı olsa da DMF'in HDAC ekspresyonunu düzenleyici rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [226,227]. DMF'in VPA ile indüklenen OSB modelinde sosyal defisitleri geri döndürmesinde epigenetik mekanizmaların da etkisi olabilir.

5.3. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde İnfant Dönemde Sosyal Becerilerin Değerlendirilmesi

Sosyal davranışların belirlenmesinde duyuşal girdilerden biri de olfaktör uyarılardır. Deneş hayvanlarında süttten kesilme öncesi sosyal tanıma, bağlanma gibi sosyal becerilerin değerlendirilmesi için anne kokusu tercih testi kullanılmaktadır [198,200]. Sosyal defisitler gösteren μ reseptörü knock-out farelerde kontrole göre tanıdık anne talaşı üzerinde geçirilen sürenin azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte annelerinden ayrılıp temiz talaşa bırakıldıklarında yüksek frekanslı ultrasonik vokalizasyonların kontrole göre daha düşük sayıda olduğu ve sonrasında anne talaşına alındıklarında

kontrol grubunda azalan ultrasonik vokalizasyonların bu hayvanlarda azalmadığı görülmüştür [200]. Prenatal 12,5. günde SC 600 mg/kg VPA enjeksiyonu yapılan farelerde anne kokusu tercih testinde kontrolün aksine maternal zonda geçirilen sürenin artmadığı, bu sürenin yabancı zonda geçirilen süre ile benzer olduğu görülmüştür [201]. Anne kokusu tercih testi bulgularımızda literatürle uyumlu şekilde VPA grubu yavrularının maternal zonda geçirdiği sürenin ve anne kokusu tercih indeksinin kontrole göre azaldığı görüldü. Bu farklılık hem dişi hem erkek yavrularda tekrarlandı ve bulgularda cinsiyete bağlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Bulgularımız cinsiyete bağlı değişiklik olmadığını gösterilmesi bakımından anne kokusu tercih testi için özgündür. VPA ile indüklenen OSB modelinde; sosyal etkileşim değerlendirmede en sık kullanılan testlerden biri olan 3 odacıklı sosyal etkileşim testinde cinsiyete özgü farklılıklar görülmesine ve modelin erkeklerde daha başarılı olduğu bildirilmesine rağmen [195] çalışmamızda anne kokusu tercih testinde her iki cinsiyette de anne kokusu tanıma indeksinin ve maternal zonda geçirilen sürenin kontrole göre azalması, dişilerde infant döneminde mevcut olan sosyal eksikliklerin adölesan dönemde ve yetişkinlikte kompanse ediliyor olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda VPA grubu erkek hayvanlarında maternal zon ile yabancı zon arasında geçirilen sürenin benzer olması bu hayvanlarda yabancı kokularla tetiklenen anksiyete yanıtının infant döneminde zayıf olduğunu göstermektedir. VPA grubu erkeklerinde yetişkinlik döneminde yapılan yükseltilmiş artı ve açık alan testlerinde de anksiyete artışı lehine bulgu saptanmadı.

5.4. VPA ile İndüklenen OSB Modelinin ve DMF'in Nöroinflamatuvar Belirteçlere Etkisi

Çalışmamızda hem serebellum hem de PFC'de proinflamatuvar sitokinlerden TNF α , İL-6, MCP1/CCL2 düzeylerinde ve antiinflamatuvar sitokin TGF β ₁ seviyesinde gruplar arasında fark bulunmadı. Hem prenatal VPA maruziyeti hem de adölesan dönemden başlanıp yetişkinliğe kadar yapılan DMF uygulaması serebellum ve PFC'de ölçülen nöroinflamatuvar belirteçleri etkilemedi.

İnsan verilerine bakıldığında; OSB'li bireylerden alınan postmortem beyin dokularında singulat korteks ve serebellumda belirgin MCP1 artışı görülürken medial frontal girusta kontrole göre fark bulunmamıştır. OSB'li bireylerde BOS incelemesinde de kontrole

göre MCP1 düzeylerinin arttığı saptanmıştır [92]. Başka bir çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında OSB'li çocuklardan alınan plazma örneklerinde MCP-1, RANTES ve eotaksin düzeylerinde artış gözlenmiş ve artan kemokin üretimi, davranış ölçeklerinde daha yüksek anormal davranış puanları ve daha fazla bozulmuş gelişimsel ve adaptif işlevle ilişkili bulunmuştur [228]. Çalışmamızda serebellumda gruplar arasında fark bulunmamasının nedeni VPA ile indüklenen OSB modelinde veya modelin oluşturulma koşullarında bu kemokinin üretiminin tetiklenmemesi olabilir. Dönemsel olarak seviye farklılıkları olsa da serebellum ve PFC dokularının alındığı yetişkinlik döneminde fark görülüyor olabilir. Çalışmamızda PFC'de MCP1/CCL2 düzeylerinin gruplar arasında benzer olması literatürle uyumludur.

OSB'li bireylerden alınan postmortem beyin dokularında yapılan ELISA ölçümlerinde bulgularımızla uyumlu şekilde medial frontal girus, anterior singulat korteks ve serebellumda İL-6 düzeyleri kontrollerle benzer bulunmuştur [92].

OSB'li çocuklardan alınan BOS örneklerinde kontrole göre TNF α 'nın yüksek olduğu saptanmıştır [229].

Çocukluk ve erişkinlik dönemindeki OSB'li bireylerde yapılan serum TGF β_1 ölçümlerinde kontrole göre anlamlı düzeyde azalma görülmüştür [230,231]. Buna karşın OSB'li bireylerden alınan beyin dokularında yapılan postmortem ölçümlerde medial frontal girus, anterior singulat korteks ve serebellumda TGF β_1 düzeylerinin kontrole göre belirgin arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada OSB'li bireylerden alınan BOS örneklerinde TGF β_1 düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür [92]. Literatürde OSB'de inflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokin düzeyleri ile ilgili sonuçlar tutarlı değildir. Çalışmamızda TGF β_1 düzeylerine bakıldığında serebellum ve PFC'de kontrolle VPA grubu arasında fark görülmemesi ölçümlerin yetişkinlik döneminde yapılmasına ve modeli oluştururken uygulanan VPA dozuna bağlı olabilir.

GFAP, esas olarak astrositlerde eksprese edilen bir tip III ara filamenttir. Reaktif astrositler için bir belirteç olarak kabul edilmektedir [232,233]. OSB'li bireylerden alınan BOS örneklerinde kontrole göre GFAP yüksekliği rapor edilmiştir [234,235]. GFAP artışı ile daha fazla sitokin salıverilmesine neden olabilecek astrogliozis ve reaktif hasar arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir [92,102]. OSB'li bireylerde beynin farklı bölgelerinde GFAP gen ekspresyonuna ilişkin veriler tartışmalıdır. Bazı çalışmalar PFC

ve serebellumda GFAP gen ekspresyonunun up-regüle olduğunu bildirirken, diğerleri OSB beyinlerinde anterior singulat korteks ve anterior prefrontal kortekste GFAP gen ekspresyonunda önemli bir değişiklik olmadığını bildirmektedir [103,104,236,237]. Prenatal 12,5. günde 600 mg/kg ip VPA enjeksiyonu ile OSB modeli oluşturulmuş Wistar sıçanlarda; postnatal 30. günde medial PFC ve primer somatosensoriyel kortekste astrosit sayısında ve GFAP sayısında artış gösterilmiştir [238]. Bizim çalışmamızda GFAP protein seviyesi bakımından gruplar arasında fark bulunmamasının nedeni VPA dozu ve deney hayvanı türü farklılığına ek olarak 60-70 günlük yetişkin yavrulardan alınan serebellum ve PFC dokularında protein düzeyi ölçümü yapılması olabilir.

5.5. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Tekrarlayıcı Davranışların Değerlendirilmesi ve Tekrarlayıcı Davranışlarda DMF Etkisi

Çalışmamızda VPA ile indüklenen OSB modelinde OSB'nin temel semptomlarından biri olan tekrarlayıcı davranışların değerlendirilmesi için yapılan grooming testinde; kümülatif grooming süresi ölçümünde gruplar arasında fark bulunmadı. OSB'nin tüm semptomlarını gösteren yaygın olarak kabul edilmiş bir deneysel modeli yoktur. Dolayısıyla modeller OSB'nin belirli patolojilerini araştırmak üzere kullanılabilir. VPA ile indüklenen OSB modeli sosyal etkileşim bozukluklarının patofizyolojisini araştırmaya uygun olsa da VPA'nın bu dozunda ve bu tür sıçanlarda tekrarlayıcı davranışlar üzerine araştırma yapmak için uygun görünmemektedir. VPA bu dozda ve bu türde tekrarlayıcı davranışların ortaya çıkmasında temel bileşenlerden biri olarak kabul edilen kortiko-striatal-talamo-kortikal devrelerde semptomatik düzeyde değişiklik yapmıyor olabilir [239,240]. Bu konuda ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dimetil fumarat uygulaması kontrol+DMF ve VPA+DMF gruplarında kümülatif grooming süresinde değişiklik yapmadı. Çalışmamız dimetil fumaratın tekrarlayıcı davranışlar üzerindeki etkisinin araştırılması yönünden özgündür.

5.6. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi ve DMF'in Lokomotor Aktiviteye Etkisi

VPA ile indüklenen OSB modelinde lokomotor aktivitenin değişimiyle ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur [241]. Çalışmamızda lokomotor aktivitenin ölçüm parametresi olarak belirlenen açık alan testinde katedilen toplam mesafeler bakımından gruplar arasında fark görülmedi. Sensorimotor gelişimi takip etmek amacıyla yapılan doğrulma, yürüme ve negatif geotaksi testlerinde de VPA grubu erkek hayvanları ve kontrol grubu hayvanları arasında fark görülmemesi prenatal VPA maruziyetinin hem infant dönemde hem de erişkin dönemde erkeklerde lokomotor aktiviteyi değiştirmediğini göstermektedir. Dimetil fumarat uygulamasının da kontrol ve VPA grubu hayvanlarında lokomotor aktivitede anlamlı düzeyde değişiklik yapmadığı görüldü.

5.7. VPA ile İndüklenen OSB Modelinde Komorbidite Değerlendirilmesi ve DMF'in Komorbid Durumlara Etkisi

OSB'ye sık eşlik eden nöropsikiyatrik hastalıklardan biri yaygın anksiyete bozukluğudur [4]. Çalışmamızda anksiyete değerlendirme amacıyla yükseltilmiş artı testi, misket gömme testi ve merkezde geçirilen sürelerin karşılaştırılması yoluyla değerlendirme yapmak için açık alan testi uygulandı. Yükseltilmiş artı testinde açık kolda geçirilen süreler bakımından gruplar arasında fark bulunmadı. Aynı zamanda OSB'ye sık eşlik eden obsesif kompulsif bozukluk araştırmalarında da temel testlerden biri olan misket gömme testinde gömülü misket sayıları bakımından gruplar arasında fark görülmedi [4,205]. Açık alan testinde merkezde geçirilen sürenin anksiyete düzeyi arttıkça azaldığı bilinmektedir [242]. Açık alan testinde merkezde geçirilen süreler bakıldığında da gruplar arasında fark görülmedi. Özgün bir bulgu olarak dimetil fumaratın da VPA ve kontrol grubu hayvanlarında anksiyete ve kompulsif davranışlar bakımından belirgin etki yapmadığı görüldü. Tüm bu bulgular bu dozda ve bu tür hayvanlarla yapılan VPA ile indüklenen OSB modelinin; anksiyete ve kompulsif davranışlar gibi komorbid durum semptomlarını belirgin olarak yansıtmadığını ve bu durumların araştırılması için uygun bir model olmadığını göstermektedir.

6. ÇALIŞMAMIZIN KISITLILIKLARI

- Çalışmamızda davranış deneyleri, TAS-TOS ve ELISA ölçümlerinde yalnızca erkek hayvanlar kullanıldı. Fakat infant döneminde sosyal bağlanmanın değerlendirildiği anne kokusu tercih testinde hem erkek hem dişi hayvanlarda sosyal bağlanmanın bozulduğu gösterildi. Dişi hayvanlarda yetişkinlik döneminde sosyal defisit ve komorbid durumların araştırılması için davranış deneylerinin yapılmaması ve mekanizmanın anlaşılması yönünde protein düzeyi ölçümlerinin yapılmaması nedeniyle dişilerde sosyal etkileşim bozukluğunun seyri değerlendirilemedi.
- Literatürde VPA ile indüklenen rodent OSB modelinde gösterilen tekrarlayıcı davranışlarda artış ve anksiyete artışının çalışmamızda gösterilememesi, misset gömme ve grooming testlerinde n sayılarının düşüklüğüne bağlı olabilir.
- Özellikle TAS-TOS testleri ve ELISA ölçümlerinde maddi kısıtlılıklar nedeniyle n sayısının düşük olması ($n=5$) çalışmamızın bir başka kısıtlı yönüdür.
- Kontrol+DMF grubunda TAS'ın azalması bulgusunun, tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi ve mekanizmasının aydınlatılması için bulgularımıza ek olarak takip çalışmaları gereklidir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Sıçanlarda VPA ile indüklenen OSB modelinde fiziksel gelişim parametreleri açısından kontrol grubuna göre fark yoktur.
2. Çalışmamızda doğrulma refleksi kazanılmasının, VPA grubu dişi yavrularda kontrol grubu dişi ve erkek yavrularına göre geciktiği görüldü. Bu durum VPA ile indüklenen OSB modelinde dişi yavrularda motor becerilerin kontrole göre geri olduğunu göstermektedir. Ancak VPA grubu erkeklerinde kontrole göre fark görülmedi. Prenatal VPA maruziyeti motor beceriler bakımından cinsiyete bağlı değişiklik gösteriyor olabilir. Bulgularımıza göre VPA ile indüklenen OSB modeli dişilerde OSB'ye eşlik eden motor becerilerde bozulmayı araştırmak için uygun bir modeldir.
3. VPA ile indüklenen OSB modelinde sosyal tanıma ve bağlanmanın değerlendirildiği anne kokusu tercih testinde, her iki cinsiyetteki yavrularda kontrole göre anne kokusu tercih indeksi azaldı. Aynı zamanda VPA grubunda yabancı zonda geçirilen sürenin kontrole göre yüksek olması yabancı kokularla anksiyetenin artmadığını göstermektedir.
4. Sprague Dawley türü gebe sıçanlara prenatal 12. günde SC 400 mg/kg VPA uygulanmasının erkek yavrularda yetişkinlik döneminde sosyal etkileşim bozukluğuna neden olduğu görüldü. Adölesan dönemde başlanıp yetişkinlik dönemine kadar 5 hafta boyunca devam eden 100 mg/kg/gün oral DMF uygulaması antioksidan yanıtı güçlendirerek sosyal etkileşim bozukluğunu geri çevirdi. Serebellum ve PFC'de Nrf2 aktivasyonunun ölçülmesi DMF'in sosyal defisitler üzerindeki terapötik etki mekanizması yönündeki bulgularımızı destekleyebilir. Aynı zamanda bir HDAC inhibitörü olduğu bilinen VPA'nın prenatal maruziyeti sonucu oluşan etkileri geri çevirmede, bulgular henüz çok sınırlı olsa da DMF'in HDAC ekspresyonu üzerindeki düzenleyici rolünün de etkisi olabilir. VPA ve DMF'in HDAC üzerine etkilerinin moleküler ve davranışsal sonuçlarını kapsayan araştırmalar OSB'nin patofizyolojisinde epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

5. DMF uygulaması hem serebellum hem de PFC'de VPA grubunda TAS'ı artırırken Kontrol+DMF grubunda azalttı. Dimetil fumaratın sağlıklı kontrollerde antioksidan yanıt üzerine etkisinin aydınlatılması için takip çalışmaları gereklidir.
6. Hem prenatal VPA maruziyeti hem de adölesan dönemden başlanıp yetişkinliğe kadar yapılan DMF uygulaması yetişkin sıçanlardan alınan serebellum ve PFC dokularında nöroinflamatuvar belirteç düzeylerini değiştirmedir.
7. VPA ile indüklenen OSB modeli VPA'nın bu dozunda ve bu tür sıçanlarda grooming artışına neden olmadı. Çalışmamızda oluşturulan OSB modeli tekrarlayıcı davranışlarda artış üzerine araştırma yapmak için uygun görünmemektedir. Prenatal VPA maruziyeti sonucu kortiko-striatal-talamo-kortikal devrelerde meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin, tekrarlayıcı davranışların arttığı bildirilen diğer OSB modelleri ile karşılaştırıldığı ileri çalışmalar bu konuya ışık tutabilir.
8. VPA ile indüklenen OSB modelinde erkeklerde hem infant dönemde hem de yetişkinlik döneminde lokomotor aktivitede belirgin değişiklik olmadı. Locomotor aktivitenin değişmemesi; belirli alanda geçirilen sürelerin ölçüldüğü anne kokusu tercih testi, 3 odacıklı sosyal etkileşim testi, yükseltilmiş artı testi gibi davranış deneyi sonuçlarının motor defisitlerden etkilenmediğini gösterir ve bulguların validasyonu bakımından olumludur.
9. Çalışmamızda VPA ile indüklenen OSB modelinde anksiyete düzeyinde ve kompulsif davranışlarda değişiklik görülmedi. Prenatal VPA maruziyetinin; bazolateral amigdala, santral amigdala, medial PFC'nin prelimbik alanı, ventral tegmental alan gibi anksiyete ilişkili olduğu bilinen beyin bölgelerinde oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle ilgili bulgular sınırlıdır ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
10. **Çalışmamız DMF'in OSB'de terapötik etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.** Tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz davranış deneylerimiz ışığında; DMF uygulamasının, hem kontrol hem de VPA gruplarında tekrarlayıcı davranışlarda, lokomotor aktivitede ve anksiyetede değişikliğe neden olmadığı ancak sosyal etkileşimi iyileştirici yönde belirgin etkisinin varlığı gösterildi.

8. KAYNAKLAR

- 1 Association A. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV-TR), text revision. (No Title). 2000.
- 2 Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child*. 1943;2(3):217-50.
- 3 Siafis S, Çıray O, Wu H, Schneider-Thoma J, Bighelli I, Krause M, et al. Pharmacological and dietary-supplement treatments for autism spectrum disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Molecular autism*. 2022;13(1):10.
- 4 Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, et al. Autism spectrum disorder. *Nature reviews Disease primers*. 2020;6(1):1-23.
- 5 Usui N, Kobayashi H, Shimada S. Neuroinflammation and oxidative stress in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5487.
- 6 Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, Hemmer B, Warnke C, Menge T, et al. Dimethyl fumarate in relapsing–remitting multiple sclerosis: rationale, mechanisms of action, pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert review of neurotherapeutics*. 2015;15(4):339-46.
- 7 Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, et al. Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(43):15550-55.
- 8 Wang Q, Chuikov S, Taitano S, Wu Q, Rastogi A, Tuck SJ, et al. Dimethyl fumarate protects neural stem/progenitor cells and neurons from oxidative damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK pathway. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):13885-907.
- 9 Shaw KA. Early identification of autism spectrum disorder among children aged 4 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2020. *MMWR Surveillance Summaries*. 2023;72.
- 10 Li Y-A, Chen Z-J, Li X-D, Gu M-H, Xia N, Gong C, et al. Epidemiology of autism spectrum disorders: Global burden of disease 2019 and bibliometric analysis of risk factors. *Frontiers in pediatrics*. 2022;10:972809.
- 11 Maenner MJ. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2020. *MMWR Surveillance Summaries*. 2023;72.
- 12 Raporu MAK. Down sendromu, otizm ve diğer gelişim bozukluklarının yaygınlığının tespiti ile ilgili bireylerin ve ailelerinin sorunlarının çözümü için alınması gereken tedbirlerin belirlenmesi amacıyla kurulan meclis araştırma komisyonu raporu. Erişim: <https://acikerisim.tbmm.gov.tr/handle/11543/3136> Erişim tarihi. 2020;25.
- 13 Soke G, Maenner M, Christensen D, Kurzius-Spencer M, Schieve L. Prevalence of co-occurring medical and behavioral conditions/symptoms among 4-and 8-year-old children with autism spectrum disorder in selected areas of the United States in 2010. *Journal of autism and developmental disorders*. 2018;48:2663-76.
- 14 Mannion A, Leader G, Healy O. An investigation of comorbid psychological disorders, sleep problems, gastrointestinal symptoms and epilepsy in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2013;7(1):35-42.
- 15 Croen LA, Zerbo O, Qian Y, Massolo ML, Rich S, Sidney S, et al. The health status of adults on the autism spectrum. *Autism*. 2015;19(7):814-23.
- 16 Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *Journal of medical genetics*. 2009;46(1):1-8.
- 17 Miles JH. Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genetics in Medicine*. 2011;13(4):278-94.
- 18 Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, et al. Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. *Journal of autism and developmental disorders*. 2005;35:103-16.
- 19 Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *Behavioural brain research*. 2013;251:95-112.

- 20 Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*. 2011;68(11):1095-102.
- 21 Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *Jama*. 2014;311(17):1770-77.
- 22 Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*. 1995;25(1):63-77.
- 23 Grønberg TK, Schendel DE, Parner ET. Recurrence of autism spectrum disorders in full- and half-siblings and trends over time: a population-based cohort study. *JAMA pediatrics*. 2013;167(10):947-53.
- 24 Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 2011;128(3):e488-e95.
- 25 Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(9):551-63.
- 26 Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature genetics*. 2014;46(8):881-85.
- 27 de la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, Geschwind DH. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature medicine*. 2016;22(4):345-61.
- 28 Krumm N, O’Roak BJ, Shendure J, Eichler EE. A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends in neurosciences*. 2014;37(2):95-105.
- 29 Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome—lessons from genomic imprinting. *Genes*. 2014;5(3):635-55.
- 30 Yoon SH, Choi J, Lee WJ, Do JT. Genetic and epigenetic etiology underlying autism spectrum disorder. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(4):966.
- 31 Ben-David E, Shifman S. Combined analysis of exome sequencing points toward a major role for transcription regulation during brain development in autism. *Molecular psychiatry*. 2013;18(10):1054-56.
- 32 Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Molecular autism*. 2017;8:1-17.
- 33 Wayne MM, Cheng HY. Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2018;72(4):228-44.
- 34 Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Human molecular genetics*. 2005;14(4):483-92.
- 35 Kubota T, Mochizuki K. Epigenetic effect of environmental factors on autism spectrum disorders. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(5):504.
- 36 Steffenburg S, Gillberg CL, Steffenburg U, Kyllerman M. Autism in Angelman syndrome: a population-based study. *Pediatric neurology*. 1996;14(2):131-36.
- 37 Yashiro K, Riday TT, Condon KH, Roberts AC, Bernardo DR, Prakash R, et al. Ube3a is required for experience-dependent maturation of the neocortex. *Nature neuroscience*. 2009;12(6):777-83.
- 38 LoParo D, Waldman I. The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2015;20(5):640-46.
- 39 Qin L, Ma K, Wang Z-J, Hu Z, Matas E, Wei J, et al. Social deficits in Shank3-deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Nature neuroscience*. 2018;21(4):564-75.
- 40 Uchino S, Waga C. SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain and Development*. 2013;35(2):106-10.

- 41 Gonçalves TF, Gonçalves AP, Rodrigues NF, dos Santos JM, Pimentel MMG, Santos-Rebouças CB. KDM5C mutational screening among males with intellectual disability suggestive of X-Linked inheritance and review of the literature. *European journal of medical genetics*. 2014;57(4):138-44.
- 42 Duffney LJ, Valdez P, Tremblay MW, Cao X, Montgomery S, McConkie-Rosell A, et al. Epigenetics and autism spectrum disorder: A report of an autism case with mutation in H1 linker histone HIST1H1E and literature review. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2018;177(4):426-33.
- 43 Cotney J, Muhle RA, Sanders SJ, Liu L, Willsey AJ, Niu W, et al. The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nature communications*. 2015;6(1):6404.
- 44 De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014;515(7526):209-15.
- 45 Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi J-M, Daoud H, Nassif C, Patry L, et al. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS genetics*. 2014;10(10):e1004772.
- 46 Helsmoortel C, Vulto-van Silfhout AT, Coe BP, Vandeweyer G, Rooms L, van den Ende J, et al. A SWI/SNF-related autism syndrome caused by de novo mutations in ADNP. *Nature genetics*. 2014;46(4):380-84.
- 47 Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*. 2003;35(3):215-17.
- 48 Hébert SS, De Strooper B. miRNAs in neurodegeneration. *Science*. 2007;317(5842):1179-80.
- 49 Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, et al. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(17):4322-30.
- 50 Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T. Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2009;238(11):2800-12.
- 51 Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2017;135(1):29-41.
- 52 Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 2011;128(2):344-55.
- 53 Conde-Agudelo A, Rosas-Bermudez A, Norton MH. Birth spacing and risk of autism and other neurodevelopmental disabilities: a systematic review. *Pediatrics*. 2016;137(5).
- 54 Curran EA, O'Neill SM, Cryan JF, Kenny LC, Dinan TG, Khashan AS, et al. Research review: birth by caesarean section and development of autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2015;56(5):500-08.
- 55 Xu G, Jing J, Bowers K, Liu B, Bao W. Maternal diabetes and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a systematic review and meta-analysis. *Journal of autism and developmental disorders*. 2014;44:766-75.
- 56 Wang Y, Tang S, Xu S, Weng S, Liu Z. Maternal body mass index and risk of autism spectrum disorders in offspring: a meta-analysis. *Scientific reports*. 2016;6(1):34248.
- 57 Jiang H-y, Xu L-l, Shao L, Xia R-m, Yu Z-h, Ling Z-x, et al. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;58:165-72.
- 58 Lam J, Sutton P, Kalkbrenner A, Windham G, Halladay A, Koustas E, et al. A systematic review and meta-analysis of multiple airborne pollutants and autism spectrum disorder. *PLoS one*. 2016;11(9):e0161851.
- 59 Rossignol DA, Genuis SJ, Frye RE. Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Translational psychiatry*. 2014;4(2):e360-e60.

- 60 Wu S, Ding Y, Wu F, Li R, Xie G, Hou J, et al. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: a systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015;55:322-32.
- 61 Janecka M, Kodesh A, Levine SZ, Lusskin SI, Viktorin A, Rahman R, et al. Association of autism spectrum disorder with prenatal exposure to medication affecting neurotransmitter systems. *Jama Psychiatry*. 2018;75(12):1217-24.
- 62 Kobayashi T, Matsuyama T, Takeuchi M, Ito S. Autism spectrum disorder and prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Toxicology*. 2016;65:170-78.
- 63 Rais TB, Rais A. Association between antidepressants use during pregnancy and autistic spectrum disorders: a meta-analysis. *Innovations in clinical neuroscience*. 2014;11(5-6):18.
- 64 Bjørk M-H, Zoega H, Leinonen MK, Cohen JM, Dreier JW, Furu K, et al. Association of prenatal exposure to antiepileptic medication with risk of autism and intellectual disability. *JAMA neurology*. 2022;79(7):672-81.
- 65 de Pablo GS, Jordá CP, Vaquerizo-Serrano J, Moreno C, Cabras A, Arango C, et al. Systematic review and meta-analysis: efficacy of pharmacological interventions for irritability and emotional dysregulation in autism spectrum disorder and predictors of response. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2023;62(2):151-68.
- 66 Rodrigues R, Lai MC, Beswick A, Gorman DA, Anagnostou E, Szatmari P, et al. Practitioner review: Pharmacological treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in children and youth with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2021;62(6):680-700.
- 67 Rossignol DA, Frye RE. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2011;53(9):783-92.
- 68 Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen J-G, et al. Keap1–nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Natural products in cancer prevention and therapy*. 2013:163-77.
- 69 Trembath D, Varcin K, Waddington H, Sulek R, Bent C, Ashburner J, et al. Non-pharmacological interventions for autistic children: An umbrella review. *Autism*. 2023;27(2):275-95.
- 70 Sandbank M, Bottema-Beutel K, Crowley S, Cassidy M, Dunham K, Feldman JJ, et al. Project AIM: Autism intervention meta-analysis for studies of young children. *Psychological bulletin*. 2020;146(1):1.
- 71 Zheng S, Kim H, Salzman E, Ankenman K, Bent S. Improving social knowledge and skills among adolescents with autism: systematic review and meta-analysis of UCLA PEERS® for adolescents. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2021:1-16.
- 72 Wang X, Zhao J, Huang S, Chen S, Zhou T, Li Q, et al. Cognitive behavioral therapy for autism spectrum disorders: A systematic review. *Pediatrics*. 2021;147(5).
- 73 Poggi C, Dani C. Sepsis and oxidative stress in the newborn: from pathogenesis to novel therapeutic targets. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018(1):9390140.
- 74 Schiavone S, Colaianna M, Curtis L. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(11):1404-12.
- 75 Brunst KJ, Baccarelli AA, Wright RJ. Integrating mitochondriomics in children's environmental health. *Journal of Applied Toxicology*. 2015;35(9):976-91.
- 76 Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life sciences*. 2004;75(21):2539-49.
- 77 McGinnis WR. Oxidative stress in autism. *Alternative Therapies in Health & Medicine*. 2004;10(6).

- 78 Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O, et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2004;254:143-47.
- 79 Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik D, Sohmen T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 2002;67(5):341-43.
- 80 James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6):1611-17.
- 81 James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2006;141(8):947-56.
- 82 Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A. The role of vitamin D in the immune system as a pro-survival molecule. *Clinical therapeutics*. 2017;39(5):894-916.
- 83 Crăciun EC, Bjørklund G, Tinkov AA, Urbina MA, Skalny AV, Rad F, et al. Evaluation of whole blood zinc and copper levels in children with autism spectrum disorder. *Metabolic brain disease*. 2016;31:887-90.
- 84 Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, et al. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *Journal of child neurology*. 2002;17(11):833-37.
- 85 Bjørklund G, Meguid NA, El-Bana MA, Tinkov AA, Saad K, Dadar M, et al. Oxidative stress in autism spectrum disorder. *Molecular neurobiology*. 2020;57:2314-32.
- 86 Ming X, Stein T, Brimacombe M, Johnson W, Lambert G, Wagner G. Increased excretion of a lipid peroxidation biomarker in autism. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 2005;73(5):379-84.
- 87 Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB journal*. 2004;18(15):1791-800.
- 88 Qasem H, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. Cysteinyl leukotriene correlated with 8-isoprostane levels as predictive biomarkers for sensory dysfunction in autism. *Lipids in health and disease*. 2016;15:1-10.
- 89 Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *International review of psychiatry*. 2005;17(6):485-95.
- 90 Korvatska E, Van de Water J, Anders TF, Gershwin ME. Genetic and immunologic considerations in autism. *Neurobiology of Disease*. 2002;9(2):107-25.
- 91 Licinio J, Alvarado I, Wong M. Autoimmunity in autism. *Molecular psychiatry*. 2002;7(4):329-29.
- 92 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2005;57(1):67-81.
- 93 Ashwood P, Wakefield AJ. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *Journal of neuroimmunology*. 2006;173(1-2):126-34.
- 94 Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *Journal of neuroimmunology*. 2006;172(1-2):198-205.
- 95 Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, Kern J, Geier D, Geier M, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2016;76(4):257-68.
- 96 Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(3):383-92.

- 97 Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science*. 2002;298(5593):556-62.
- 98 Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA. Role for glia in synaptogenesis. *Glia*. 2004;47(3):209-16.
- 99 Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(9):748-55.
- 100 Bauer J, Rauschka H, Lassmann H. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia*. 2001;36(2):235-43.
- 101 Vakilzadeh G, Falcone C, Dufour B, Hong T, Noctor SC, Martínez-Cerdeño V. Decreased number and increased activation state of astrocytes in gray and white matter of the prefrontal cortex in autism. *Cerebral Cortex*. 2022;32(21):4902-12.
- 102 Laurence J, Fatemi S. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *The Cerebellum*. 2005;4:206-10.
- 103 Crawford JD, Chandley MJ, Szebeni K, Szebeni A, Waters B, Ordway GA. Elevated GFAP protein in anterior cingulate cortical white matter in males with autism spectrum disorder. *Autism Research*. 2015;8(6):649-57.
- 104 Sciarra AN, Beasley B, Crawford JD, Anderson EP, Carrasco T, Zheng S, et al. Neuroinflammatory gene expression alterations in anterior cingulate cortical white and gray matter of males with autism spectrum disorder. *Autism Research*. 2020;13(6):870-84.
- 105 Yenkovyan K, Grigoryan A, Fereshetyan K, Yepremyan D. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behavioural brain research*. 2017;331:92-101.
- 106 Xu X, Miller EC, Pozzo-Miller L. Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:97.
- 107 Tang G, Rios PG, Kuo S-H, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiology of disease*. 2013;54:349-61.
- 108 Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallett MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Jama*. 2011;306(18):2001-10.
- 109 Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, et al. Mapping early brain development in autism. *Neuron*. 2007;56(2):399-413.
- 110 Opris I, Casanova MF. Prefrontal cortical minicolumn: from executive control to disrupted cognitive processing. *Brain*. 2014;137(7):1863-75.
- 111 Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Archives of neurology*. 2007;64(7):945-50.
- 112 Casanova MF, van Kooten IA, Switala AE, van Engeland H, Heinsen H, Steinbusch HW, et al. Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta neuropathologica*. 2006;112:287-303.
- 113 Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, et al. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica*. 2010;119:755-70.
- 114 Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'Ayan A, Samocha KE, Sabo A, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 2012;485(7397):242-45.
- 115 O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*. 2012;338(6114):1619-22.
- 116 O'Roak B, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe B, et al. et al.(2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*.485.
- 117 Deriziotis P, O'Roak BJ, Graham SA, Estruch SB, Dimitropoulou D, Bernier RA, et al. De novo TBR1 mutations in sporadic autism disrupt protein functions. *Nature communications*. 2014;5(1):4954.
- 118 Traylor R, Dobyns W, Rosenfeld J, Wheeler P, Spence J, Bandholz A, et al. Investigation of TBR1 hemizyosity: four individuals with 2q24 microdeletions. *Molecular syndromology*. 2012;3(3):102-12.

- 119 Palumbo O, Fichera M, Palumbo P, Rizzo R, Mazzolla E, Cocuzza DM, et al. TBR1 is the candidate gene for intellectual disability in patients with a 2q24. 2 interstitial deletion. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014;164(3):828-33.
- 120 Persico A, D'agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, et al. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular psychiatry*. 2001;6(2):150-59.
- 121 Wang Z, Hong Y, Zou L, Zhong R, Zhu B, Shen N, et al. Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: An integrated meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2014;165(2):192-200.
- 122 Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(1):150-59.
- 123 Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature reviews neuroscience*. 2004;5(2):97-107.
- 124 Pizzarelli R, Cherubini E. Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural plasticity*. 2011;2011(1):297153.
- 125 Rubenstein J, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*. 2003;2(5):255-67.
- 126 Casanova MF. The neuropathology of autism. *Brain pathology*. 2007;17(4):422-33.
- 127 Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'shea DJ, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*. 2011;477(7363):171-78.
- 128 Eichler SA, Meier JC. EI balance and human diseases—from molecules to networking. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2008;1:195.
- 129 Fatemi SH, Halt AR, Sary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biological psychiatry*. 2002;52(8):805-10.
- 130 Yip J, Soghomonian J-J, Blatt GJ. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta neuropathologica*. 2007;113:559-68.
- 131 Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. Increased GAD67 mRNA expression in cerebellar interneurons in autism: implications for Purkinje cell dysfunction. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(3):525-30.
- 132 Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: an in situ hybridization study. *Autism Research*. 2009;2(1):50-59.
- 133 Shao Y, Cuccaro M, Hauser E, Raiford K, Menold M, Wolpert C, et al. Fine mapping of autistic disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(3):539-48.
- 134 Oblak AL, Gibbs TT, Blatt GJ. Decreased GABAB receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Journal of neurochemistry*. 2010;114(5):1414-23.
- 135 Snijders TM, Milivojevic B, Kemner C. Atypical excitation–inhibition balance in autism captured by the gamma response to contextual modulation. *NeuroImage: clinical*. 2013;3:65-72.
- 136 Brüne M, Brüne-Cohrs U. Theory of mind—evolution, ontogeny, brain mechanisms and psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2006;30(4):437-55.
- 137 Baron-Cohen S, Leslie AM, Frith U. Does the autistic child have a “theory of mind”? *Cognition*. 1985;21(1):37-46.
- 138 Baron-Cohen S, Ring HA, Bullmore ET, Wheelwright S, Ashwin C, Williams S. The amygdala theory of autism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2000;24(3):355-64.
- 139 Silani G, Bird G, Brindley R, Singer T, Frith C, Frith U. Levels of emotional awareness and autism: an fMRI study. *Social neuroscience*. 2008;3(2):97-112.

- 140 Rizzolatti G, Fabbri-Destro M, Cattaneo L. Mirror neurons and their clinical relevance. *Nature clinical practice neurology*. 2009;5(1):24-34.
- 141 Hadjikhani N, Joseph RM, Snyder J, Tager-Flusberg H. Anatomical differences in the mirror neuron system and social cognition network in autism. *Cerebral cortex*. 2006;16(9):1276-82.
- 142 Hyde KL, Samson F, Evans AC, Mottron L. Neuroanatomical differences in brain areas implicated in perceptual and other core features of autism revealed by cortical thickness analysis and voxel-based morphometry. *Human brain mapping*. 2010;31(4):556-66.
- 143 Southgate V, Hamilton AFdC. Unbroken mirrors: Challenging a theory of autism. *Trends in cognitive sciences*. 2008;12(6):225-29.
- 144 Ruyschaert L, Warreyn P, Wiersema JR, Oostra A, Roeyers H. Exploring the role of neural mirroring in children with autism spectrum disorder. *Autism Research*. 2014;7(2):197-206.
- 145 Ergaz Z, Weinstein-Fudim L, Ornoy A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*. 2016;64:116-40.
- 146 Chen JA, Peñagarikano O, Belgard TG, Swarup V, Geschwind DH. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10:111-44.
- 147 Wolterink G, Daenen LE, Dubbeldam S, Gerrits MA, van Rijn R, Kruse CG, et al. Early amygdala damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders. *European Neuropsychopharmacology*. 2001;11(1):51-59.
- 148 Schneider M, Koch M. Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(5):944-57.
- 149 Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, Caston J. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behavioural brain research*. 2000;112(1-2):107-17.
- 150 Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behavioural brain research*. 2009;204(2):313-21.
- 151 Rahman M, Nguyen H. Valproic acid. 2020.
- 152 Lewis JR. Valproic acid (Depakene): A new anticonvulsant agent. *Jama*. 1978;240(20):2190-92.
- 153 Koch-Weser J. Valproic acid. *N Engl J Med*. 1980;302:661-66.
- 154 Willmore LJ. Divalproex and epilepsy. *Psychopharmacology bulletin*. 2003;37:43-53.
- 155 Cipriani A, Reid K, Young AH, Macritchie K, Geddes J. Valproic acid, valproate and divalproex in the maintenance treatment of bipolar disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013(10).
- 156 Linde M, Mulleners WM, Chronicle EP, McCrory DC, Cochrane Pain P, Group SC. Valproate (valproic acid or sodium valproate or a combination of the two) for the prophylaxis of episodic migraine in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 1996;2016(7).
- 157 Mabunga DFN, Gonzales ELT, Kim J-w, Kim KC, Shin CY. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Experimental neurobiology*. 2015;24(4):285.
- 158 Safarian N, Shakib P, Rajabzadeh A, Zarei L. The effect of thyme honey on the histopathological changes of the testis in relation to the side effects of Valproic acid in adult male Wistar rats. *Andrologia*. 2023;2023(1):9913454.
- 159 McLaughlin DB, Andrews JA, Hooper WD, Cannell GR, Eadie MJ, Dickinson RG. Apparent autoinduction of valproate β -oxidation in humans. *British journal of clinical pharmacology*. 2000;49(5):409-15.
- 160 Christianson AL, Chester N, Kromberg JG. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 1994;36(4):361-69.
- 161 Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology*. 1996;370(2):247-61.

- 162 Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Tourlet S, Guilloteau D, Chalon S, Andres CR. Fetal exposure to
teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.
2011;35(5):1254-65.
- 163 Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?
Reproductive toxicology. 2009;28(1):1-10.
- 164 Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct
target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of
Biological Chemistry*. 2001;276(39):36734-41.
- 165 Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with
transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International
journal of Neuropsychopharmacology*. 2013;16(1):91-103.
- 166 Simon G, Moog C, Obert G. Valproic acid reduces the intracellular level of glutathione and
stimulates human immunodeficiency virus. *Chemico-biological interactions*. 1994;91(2-
3):111-21.
- 167 Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, Manco R, Chiarelli F. Increased oxidative stress in
epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy research*. 2008;78(2-3):171-77.
- 168 Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, Zaman F, Reza HM. Astaxanthin improves behavioral
disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism.
Behavioural brain research. 2015;286:112-21.
- 169 Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, et al. The histone
deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2.
The EMBO journal. 2003.
- 170 MacDonald JL, Roskams AJ. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of
neuro-glial development. *Developmental dynamics: an official publication of the American
Association of Anatomists*. 2008;237(8):2256-67.
- 171 Linker RA, Gold R. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of
action, effectiveness, and side effects. *Current neurology and neuroscience reports*.
2013;13(11):1-7.
- 172 Schweckendiek W. Treatment of psoriasis vulgaris. *Medizinische Monatsschrift*.
1959;13(2):103-04.
- 173 Landeck L, Asadullah K, Amasuno A, Pau-Charles I, Mrowietz U. Dimethyl fumarate (DMF) vs.
monoethyl fumarate (MEF) salts for the treatment of plaque psoriasis: a review of clinical
data. *Archives of dermatological research*. 2018;310:475-83.
- 174 Linker RA, Haghikia A. Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence
and place in therapy. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2016;7(4):198-207.
- 175 Aubets J, Jansat JM, Salva M, Birks VM, Cole RJ, Lewis J, et al. No evidence for interactions of
dimethylfumarate (DMF) and its main metabolite monomethylfumarate (MMF) with human
cytochrome P450 (CYP) enzymes and the P-glycoprotein (P-gp) drug transporter.
Pharmacology Research & Perspectives. 2019;7(6):e00540.
- 176 Matteo P, Federico D, Emanuela M, Giulia R, Tommaso B, Alfredo G, et al. New and old
horizons for an ancient drug: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical perspectives
of dimethyl fumarate. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2732.
- 177 di Nuzzo L, Orlando R, Nasca C, Nicoletti F. Molecular pharmacodynamics of new oral drugs
used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug design, development and therapy*.
2014:555-68.
- 178 Hoffmann C, Dietrich M, Herrmann A-K, Schacht T, Albrecht P, Methner A. Dimethyl fumarate
induces glutathione recycling by upregulation of glutathione reductase. *Oxidative medicine
and cellular longevity*. 2017;2017(1):6093903.
- 179 Cuadrado A, Kügler S, Lastres-Becker I. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2
provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy. *Redox biology*. 2018;14:522-
34.

- 180 Piroli GG, Manuel AM, Patel T, Walla MD, Shi L, Lanci SA, et al. Identification of Novel Protein Targets of Dimethyl Fumarate Modification in Neurons and Astrocytes Reveals Actions Independent of Nrf2 Stabilization*[S]. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019;18(3):504-19.
- 181 Linker RA, Lee D-H, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(3):678-92.
- 182 Kastrati I, Siklos MI, Calderon-Gierszal EL, El-Shennawy L, Georgieva G, Thayer EN, et al. Dimethyl fumarate inhibits the nuclear factor κ B pathway in breast cancer cells by covalent modification of p65 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(7):3639-47.
- 183 de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, van de Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *European journal of immunology*. 1996;26(9):2067-74.
- 184 Parodi B, Rossi S, Morando S, Cordano C, Bragoni A, Motta C, et al. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta neuropathologica*. 2015;130:279-95.
- 185 Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular basis of disease*. 2017;1863(2):585-97.
- 186 Ruggieri S, Tortorella C, Gasperini C. Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis. *Therapeutics and clinical risk management*. 2014:229-39.
- 187 Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2013;53:401-26.
- 188 Kobayashi A, Kang M-I, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(16):7130-39.
- 189 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;236(2):313-22.
- 190 Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox biology*. 2019;21:101059.
- 191 Nadeem A, Ahmad SF, Al-Ayadhi LY, Attia SM, Al-Harbi NO, Alzahrani KS, et al. Differential regulation of Nrf2 is linked to elevated inflammation and oxidative stress in monocytes of children with autism. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;113:104554.
- 192 Meguid NA, Dardir AA, Abdel-Raouf ER, Hashish A. Evaluation of oxidative stress in autism: defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation. *Biological trace element research*. 2011;143:58-65.
- 193 Bhandari R, Kaur J, Kaur S, Kuhad A. The Nrf2 pathway in psychiatric disorders: pathophysiological role and potential targeting. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2021.
- 194 Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Yang S-I, Cheong JH, et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague–Dawley rats. *Toxicology letters*. 2011;201(2):137-42.
- 195 Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(6):728-40.
- 196 Kavitha U, Kayalvizhi E, Revathy K, Brindha T, Muthulakshmi R, Chandrasekar M. A systematic review on Valproate induced rat model of autism: Pathophysiology, treatment, developmental and neurobehavioral assessment of rat offsprings. *Biomedicine*. 2021;41(1):9-15.

- 197 Nguyen AT, Armstrong EA, Yager JY. Neurodevelopmental reflex testing in neonatal rat pups. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2017(122):e55261.
- 198 Kane MJ, Angoa-Peréz M, Briggs DI, Sykes CE, Francescutti DM, Rosenberg DR, et al. Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism. *PloS one*. 2012;7(11):e48975.
- 199 Ruhela RK, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Annals of neurosciences*. 2019;26(1):25-31.
- 200 Moles A, Kieffer BL, d'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Science*. 2004;304(5679):1983-86.
- 201 Yang E-J, Ahn S, Lee K, Mahmood U, Kim H-S. Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PloS one*. 2016;11(4):e0153298.
- 202 Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nature protocols*. 2020;15(10):3464-77.
- 203 Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Park JH, Kim HJ, et al. Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of neurochemistry*. 2013;124(6):832-43.
- 204 Kim J-W, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, et al. Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PloS one*. 2014;9(8):e104927.
- 205 Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013(82):e50978.
- 206 Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14(3):149-67.
- 207 Eilam D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behavioural brain research*. 2003;142(1-2):53-62.
- 208 Chiu K, Lau WM, Lau HT, So K-F, Chang RC-C. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2007(7).
- 209 Spijker S. Dissection of rodent brain regions. *Neuroproteomics*. Springer; 2011. p. 13-26.
- 210 Favre MR, Barkat TR, LaMendola D, Khazen G, Markram H, Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2013;7:88.
- 211 Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-89.
- 212 Corbett BA, Muscatello RA, Horrocks BK, Klemencic ME, Tanguturi Y. Differences in body mass index (BMI) in early adolescents with autism spectrum disorder compared to youth with typical development. *Journal of autism and developmental disorders*. 2021;51:2790-99.
- 213 Berkeley SL, Zittel LL, Pitney LV, Nichols SE. Locomotor and object control skills of children diagnosed with autism. *Adapted physical activity quarterly*. 2001;18(4):405-16.
- 214 Ghaziuddin M, Butler E. Clumsiness in autism and Asperger syndrome: A further report. *Journal of Intellectual Disability Research*. 1998;42(1):43-48.
- 215 Green D, Baird G, Barnett AL, Henderson L, Huber J, Henderson SE. The severity and nature of motor impairment in Asperger's syndrome: a comparison with specific developmental disorder of motor function. *Journal of child psychology and psychiatry*. 2002;43(5):655-68.
- 216 Leary MR, Hill DA. Moving on: autism and movement disturbance. *Mental Retardation-Washington*. 1996;34(1):39-53.
- 217 Ozonoff S, Young GS, Goldring S, Greiss-Hess L, Herrera AM, Steele J, et al. Gross motor development, movement abnormalities, and early identification of autism. *Journal of autism and developmental disorders*. 2008;38:644-56.

- 218 Vernazza-Martin S, Martin N, Vernazza A, Lepellec-Muller A, Rufo M, Massion J, et al. Goal directed locomotion and balance control in autistic children. *Journal of autism and developmental disorders*. 2005;35:91-102.
- 219 Anshu K, Nair AK, Srinath S, Laxmi TR. Altered Developmental Trajectory in Male and Female Rats in a Prenatal Valproic Acid Exposure Model of Autism Spectrum Disorder. *Journal of autism and developmental disorders*. 2023;53(11):4390-411.
- 220 Wang R, Tan J, Guo J, Zheng Y, Han Q, So K-F, et al. Aberrant development and synaptic transmission of cerebellar cortex in a VPA induced mouse autism model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12:500.
- 221 Crespi BJ. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in ecology & evolution*. 2001;16(4):178-83.
- 222 Ebstein RP, Israel S, Chew SH, Zhong S, Knafo A. Genetics of human social behavior. *Neuron*. 2010;65(6):831-44.
- 223 Chen P, Hong W. Neural circuit mechanisms of social behavior. *Neuron*. 2018;98(1):16-30.
- 224 Liu Y, Yang Z, Du Y, Shi S, Cheng Y. Antioxidant interventions in autism spectrum disorders: A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2022;113:110476.
- 225 Bambini-Junior V, Zanatta G, Nunes GDF, de Melo GM, Michels M, Fontes-Dutra M, et al. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience letters*. 2014;583:176-81.
- 226 Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Braun D, Guizzetti M, Zhang X, et al. Dimethyl fumarate regulates histone deacetylase expression in astrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 2013;263(1-2):13-19.
- 227 Lückel C. Dimethyl fumarate suppresses Tc17 cell fate in autoimmunity via ROS accumulation. 2018.
- 228 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *Journal of neuroimmunology*. 2011;232(1-2):196-99.
- 229 Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor- α in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatric neurology*. 2007;36(6):361-65.
- 230 Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, et al. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *Journal of neuroimmunology*. 2008;204(1-2):149-53.
- 231 Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, et al. Decreased serum levels of transforming growth factor- β 1 in patients with autism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2007;31(1):187-90.
- 232 Colombo E, Farina C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends in immunology*. 2016;37(9):608-20.
- 233 Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu F-C, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996;17(4):607-15.
- 234 Ahlsén G, Rosengren L, Belfrage M, Palm A, Haglid K, Hamberger A, et al. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of children with autism and other neuropsychiatric disorders. *Biological psychiatry*. 1993;33(10):734-43.
- 235 Rosengren LE, Wikkelso C, Hagberg L. A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *Journal of neuroscience methods*. 1994;51(2):197-204.
- 236 Edmonson C, Ziats MN, Rennert OM. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular autism*. 2014;5:1-9.
- 237 Purcell A, Jeon O, Zimmerman A, Blue M, Pevsner J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*. 2001;57(9):1618-28.

- 238 Deckmann I, Santos-Terra J, Fontes-Dutra M, Körbes-Rockenbach M, Bauer-Negrini G, Schwingel GB, et al. Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2021;81(7):579-604.
- 239 Graybiel AM, Grafton ST. The striatum: where skills and habits meet. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(8):a021691.
- 240 Lewis M, Kim S-J. The pathophysiology of restricted repetitive behavior. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2009;1:114-32.
- 241 Chaliha D, Albrecht M, Vaccarezza M, Takechi R, Lam V, Al-Salami H, et al. A systematic review of the valproic-acid-induced rodent model of autism. *Developmental neuroscience*. 2020;42(1):12-48.
- 242 Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33.

Şimdiye Kadar Projeden Elde Edilen Yayınlar

- 1) 20. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 19-23 Ekim 2022, Acıbadem Üniversitesi, İstanbul "Valproik asitle indüklenen sıçan otizm modelinde nörogelişimsel parametrelerin değerlendirilmesi" başlıklı poster sunumu ile.
- 2) Karadağ K, Tümer V, Ertunç AM. Evaluation of neurodevelopmental parameters in valproic acid induced rat autism model. *Anatomy: International Journal of Experimental & Clinical Anatomy*. 2022;16.

