T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROPİYONİK ASİT İLE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN RAT OTİZM MODELİNDE MİKROGLİA AKTİVASYONU, NÖROENFLAMASYON VE NÖRONAL KAYIP VARLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye BAŞER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Recep KEŞLİ

KONYA-2020

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROPİYONİK ASİT İLE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN RAT OTİZM MODELİNDE MİKROGLİA AKTİVASYONU, NÖROENFLAMASYON VE NÖRONAL KAYIP VARLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye BAŞER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Recep KEŞLİ

İkinci Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ceyhan UĞURLUOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20202006 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini ve zamanını esirgemeyerek her fırsatta yakından ilgilenen, yol gösteren danışmanım ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Recep KEŞLİ' ye sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca ikinci tez danışmanım Tıbbi Patoloji öğretim üyesi Doç. Dr. Ceyhan UĞURLUOĞLU' ya katkı ve destekleri için teşekkür ederim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK, Prof. Dr. Uğur ARSLAN, Doç. Dr. Hatice TÜRK DAĞI ve Doç. Dr. Salih MAÇİN' e gerek teorik destekleri gerekse laboratuvar destekleri için sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince laboratuvar pratikleri ve güler yüzleriyle bana manevi destek olan tüm mikrobiyoloji laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda deney hayvanları ile ilgili bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Vet. Hek. Salih Metin GÖKYAPRAK, Vet. Sağ. Tek. Mehmet KÖSEN, Murat ARDIÇ ve Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi personellerine teşekkür ederim.

Deney hayvanları üzerinde intraserebroventriküler enjeksiyon, cerrahi işlemler ve tez yazım aşamasında çok büyük katkı sağlayan, manevi desteğini esirgemeyen Siirt Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Farmakoloji ve Toksikoloji öğretim üyesi Arş. Gör. Dr. Devran COŞKUN' a sonsuz teşekkür ederim.

Beyin dokuları üzerinde patoloji laboratuvar çalışmaları ve histopatolojik incelemeler konusunda bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Veterinerlik Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Mustafa Kemal ÇİFTÇİ, Arş. Gör. Dr. Mehmet Burak ATEŞ ve Arş. Gör. Zeynep ÇELİK' e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden son gününe başımın sıkıştığı her zaman yanımda olan ve bana yol gösteren, hüznümü ve sevinçlerimi gönülden paylaştığım arkadaşım, doktora öğrencisi Masma SHAHBAZOVA' ya teşekkür ederim.

Tezin zorlu aşamalarından benimle beraber geçen, her zaman bana moral veren ve desteğini bir an olsa bile üzerimden esirgemeyen can dostum Rumeysa ADIGÜZEL' e çok teşekkür ederim.

20202006 nolu proje ile tezimin yürütülmesinde malzeme araç gereç ve maddi olanak sağlayan Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden desteklerini, sevgilerini ve sabırlarını hiç esirgemeyen, zor zamanlarında her zaman arkamda olan canım babam Özgün BAŞER, canım annem Aliye BAŞER ve canım kardeşim Ersel BAŞER' e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar teşekkür ederim.

Sümeyye BAŞER

KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR..... Vİİ

ŞEKİL VE TABLOLAR.....Vİİİ

ÖZET..... X

SUMMARY.....Xİ

1. GİRİŞ..... 1

2. GENEL BİLGİLER..... 3

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)..... 3

2.1.1. Tanım..... 3

2.1.2. Otizm Spektrum Bozukluğu Tarihçe..... 3

2.1.3. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanı Kriterleri..... 4

2.1.4. Otizm Spektrum Bozukluğu Epidemiyoloji..... 4

2.1.5. Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyoloji ve Risk Faktörleri..... 5

2.1.6. Otizm Spektrum Bozukluğu ve Bağırsak Mikrobiyotası..... 12

2.1.7. Deneysel OSB Hayvan Modelleri..... 16

2.2. Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA)..... 18

2.2.1. Propiyonik Asit (PPA)..... 19

2.2.2. Propiyonik Asit ve Otizm Spektrum Bozukluğu..... 19

2.3. Nöroenflamasyon..... 22

2.3.1. Kan Beyin Bariyeri (KBB)..... 23

2.3.2. Mikroglia Hücreleri..... 23

2.3.3. Astrositler..... 24

2.3.4. Sitokinler..... 25

2.3.5. Endotelyal Hücreler..... 26

2.3.6. Nöroenflamasyon ve Otizm Spektrum Bozukluğu 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 31
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 31
3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler 31
3.3. Ratların Temini ve Bakımı 31
3.4. Grupların Oluşturulması 32
3.5. İntraserebroventriküler (i.s.v.) Enjeksiyon 33
3.6. Morris Su Tankı Testi (MSTT) 37
3.7. Ötenazi, Beyin Dokusu Diseksiyonu ve Makroskobik Muayene 38
3.8. Histopatolojik Analizler 40
3.8.1. Hematoksilen Eozin Boyama 40
3.8.2. Nissl Boyama Metodu 40
3.9. İmmunohistokimyasal analizler 41
3.10. İstatistiksel analizler 42
3.10.1. Davranış Testi İstatiksel Analizler 42
3.10.2. Histopatoloji İstatiksel Analizler 42
4. BULGULAR 43
4.1. Morris Su Tankı Testi (MSTT) Bulguları 43
4.2. Histopatolojik Bulgular 44
4.3. İmmunohistokimyasal bulgular 55
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
7. KAYNAKLAR 66
EK-A: Etik Kurul Kararı 84
EK-B: Turnitin Raporu 85

9. ÖZGEÇMİŞ 93

SİMGELER VE KISALTMALAR

CDC **:**Centers for Disease Control and Prevention

ÇG **:**Çalışma Grubu

DSM **:**Diagnostic and Statistical Manuel Disorders

GABA **:**Gama amino bütirik asit

GF **:**Germ free

GFAP **:**Glial fibriler asidik protein

Hem. **:**Hematoksilen

HPA **:**Hipotalamus pitüiter adrenal eksen

İHK **:**İmmünohistokimyasal boyama

i.s.v. **:**İntraserebroventriküler

KBB **:**Kan Beyin Bariyeri

KZYA **:**Kısa Zincirli Yağ Asidi

KG **:**Kontrol grubu

MİA **:**Maternal immün sistem aktivasyonu

MSS **:**Merkezi sinir sistemi

µl **:**mikrolitre

µm **:**mikrometre

MSTT **:**Morris su tankı testi

NK **:**Natural Killers

NS **:**Nissl boyama

OSB **:**Otizm Spektrum Bozukluğu

poly:C **:**Polisitidilik acid

PPA **:**Propiyonik Asit

ŞEKİL VE TABLOLAR

Şekil 1. **A**: Çalışma gruplarının oluşturulması **B**: Kontrol gruplarının oluşturulması **C**: Gruplarda yer alan ratların tartılması. 33

Şekil 2. A: Sağ ventrikül tespiti için kullanılan stereotaksi cihazı **B:** Stereotaksik koordinat noktaları belirlenen rata PPA enjeksiyonu aşaması. 34

Şekil 3. Morris Su Tankı ve kadranlara ait göstergeler. 38

Şekil 4. **A:** Beyin dokusu diseksiyonu, **B:** Rat beyin dokusu, **C:** Sağ ve sol hemisfer, **D:** Sol hipokampüs. 39

Şekil 5. Serebral korteks kalınlığının belirlenmesi, 4X, NS. 41

Şekil 6. Meninkslerde kanama ve inflamasyon, ÇG2, 20X, HE. 45

Şekil 7. Meninkslerde kanama, ödem ve inflamasyona bağlı kalınlaşma, 20X, HE. 45

Şekil 8. Perinörönal ödem (siyah ok), nöronal dejenerasyon (mavi ok), nöronofaji (kırmızı ok) ve gliozis, 40X, HE. 46

Şekil 9. Serebral korteksde fokal malazi alanları, **A:** ÇG1 grubu, **B:** ÇG7 grubu, lipofuksin pigmenti (ok), 40X, HE. 46

Şekil 10. Serebral korteksinde eksternal granüler-pramidal katmanındaki küçük ve orta büyüklükteki pramidal nöronlar, **A:** Normal nörönlar, KG5 grubu, **B:** Primidal nöronlarda azalma (hafif), ÇG11 grubu; **C:** Orta şiddette nörönal kayıp, ÇG8 grubu; **D:** Şiddetli nöronal kayıp, ÇG17 grubu, 40X, HE. 47

Şekil 11. Purkinje (gangliyon) katmanı, serebellum. **A:** Normal Purkinje hücreleri, kontrol (1) grubu, X20; **B:** Normal Purkinje hücreleri (oklar), kontrol (1) grubu X40; **C,E:** Dejenere Purkinje hücreleri, çalışma grubu (1,2), X20; **D,F:** Dejenere Purkinje hücreleri, çalışma grubu (oklar), (1,2), X40, HE. 48

Şekil 12. CA1 ve CA3 katmanlarının gruplara göre mikrofotoğrafları, hipokampüs, serebrum, X40, NS. 52

Şekil 13. CD68 immunoreaktivitesi. **A:** Meninkslerde yoğun CD68 immunboyaması, ÇG7, X20, DAB-Hematoksilen; **B:**Meninkslerden nöropil dokuya yayılan (serebral korteks) immunoreaktivite, ÇG13, X20, DAB-Hematoksilen; **C:** Subependimal bölgede immunorektivite, ÇG12, X20, DAB-Hematoksilen; **D:** Nöropil dokuda yoğun immunoreaktivite, ÇG8, X20, DAB-Hematoksilen..... 56

Şekil 14. GFAP immunorektivitesi, hipokampüs, X40, DAB-Hematoksilen; **A:** Kontrol 4; **B:** Kontrol 2; **C:** Çalışma 7; **D:** Çalışma 9; **E:** Çalışma13, **F:** Çalışma 3. 58

Şekil 15. GFAP immunorektivitesi, serebral korteks, X40, DAB-Hematoksilen; **A:** Kontrol 1; **B:** Kontrol 4; **C:**Çalışma 3; **D:** Çalışma 5; **E:** Çalışma 14, **F:** Çalışma 12. 59

Tablo 1. Gruplarda yer alan hayvanların bregma ve lambda koordinatları. 35

Tablo 2. Sağ ventrikül beyin bölgeleri ve stereotaksik koordinatlar. 35

Tablo 3. Sağ ventrikül stereotaksik koordinat noktaları. 36

Tablo 4. Sağ ventrikül i.s.v. enjeksiyon yapılan stereotaksik koordinatlar. 36

Tablo 5. Primer Antikorlara göre İmmunohistokimyasal Boyama Protokolleri. 42

Tablo 6. Çalışma grubu PPA enjeksiyonu öncesi ve sonrası ortalama platformu bulma süreleri. 43

Tablo 7. Gruplara göre serebral korteks kalınlığı, hipokampüs CA1 ve CA3 pramidal katman kalınlığı ve hücre sayısı ölçümlerinin sonuçları. 50

Tablo 8. İncelenen parametrelerin istatistiksel sonuçları* 51

Tablo 9. Vakalara göre boyanma yoğunlukları ve skorlar. 54

Tablo 10. Boyanma yoğunluklarına göre skor aralıkları. 55

Tablo 11. Boyanma yoğunluklarına göre skorlamanın yapılması. 55

Tablo 12. Deneme grubu hayvanlarına göre GFAP immunoreaktivite sonuçları. 57

Tablo 13. GFAP immunoreaktivite sonuçlarının istastiksel gösterimi.* 58

Grafik 1. Çalışma grubu PPA enjeksiyonu öncesi ve sonrası 16 günde ortalama platformu bulma süreleri. 44

ÖZET

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Propiyonik Asit İle Deneysel Olarak Oluşturulan Rat Otizm Modelinde Mikroglia Aktivasyonu, Nöroenflamasyon ve Nöronal Kayıp Varlıklarının Değerlendirilmesi

Sümeyye BAŞER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar

Prof. Dr. Recep KEŞLİ

Doç. Dr. Ceyhan UĞURLUOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2020

Otizm Spektrum Bozukluğu öğrenme, konuşma becerilerinde ve sosyal becerilerde gerileme, ardışık anlamsız tekrar hareketleri gibi davranış bozuklukları ile karakterize nöro gelişimsel bir bozukluktur. Otizmin etiyolojisi kesin olarak bilinememektedir. Bireylerde nöron sayısında azalma ve nöronal değişiklikler görülmektedir. Araştırmalar doğrultusunda otizmde CD68 immün reaktivitesinin mikroglia aktivasyonu ile glial fibriler asidik protein (GFAP) immün reaktivitesinin ise reaktif astrogliozis ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Çalışma modelde meydana gelen davranış bozuklukları ve beyinde meydana gelen nöroenflamasyonu belirlemek üzere yapıldı. 20'si çalışma, 5'i ise kontrol grubu toplam 25 adet rat kullanıldı.

Çalışma grubunu oluşturan 20 ratın için otizm modeli oluşturmadan önce ve sonrasında olmak üzere davranış testi yapılarak skorları kaydedildi. Daha sonra 20 ratın sağ ventrikül bölgesi ile stereotaksi cihazı kullanılarak tespit edildi. Bu noktada belirlenen bölgeye tek doz propiyonik asit (PPA) (4 µl, 0,26 M solüsyonu) 10. günde sağ ventrikülden verildi. Ratlar 21. günde sakrifikasyon işleminin ardından hipokampüs dokusu elde edilerek incelemeler yapıldı. Davranış testi neticesinde önce-sonra zaman ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,001<0,05$, $F=22,978$). Önce-Sonra*Gün etkileşiminde grup ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,001<0,05$, $F=69,820$). Önce ve sonra grupları gün bazında incelendiğinde tüm günler ile fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,001<0,05$). Yapılan incelemeler doğrultusunda serebral korteks ve hipokampal bölgedeki (özellikle CA1 ve CA3 bölgesi primidal katmandaki) nöronların küçük, piknotik ve hiperkromatik çekirdeklerle distrofik değişiklikler gösterdiği saptandı. İki grubun istatisksel karşılaştırılmasında çalışma grubunun CA3 primidal hücre katman kalınlığında önemli derecede azalma gözlendi ($P<0,01$). Bu katmandaki primidal hücre sayıları çalışma grubunda istatistiki yönden önemli derece azaldığı bulundu ($P<0,01$). Ayrıca bu nöronlarda düzensiz kromatoliz ve anormal Nissl granül dağılımı nedeniyle yoğunluklarının arttığı (koyu boyanma) belirlendi.

CD68 için yapılan boyamalarda hem kontrol hemde çalışma grubundaki ratların nöropil dokularında değerlendirelebilecek/skorlanabilecek bir immunoreaktiviteye rastlanılmadı. Astrosit ekspresyonunun önemli bir göstergesi olan GFAP pozitif hücre sayısının PPA uygulanan ratlarda serebral korteks ve hipokampal bölgede istatistiksel olarak önemli oranda artığı belirlendi ($P<0,01$). Sonuç olarak bakteri metabolit ürünü olan PPA kan beyin bariyerini geçmektedir. PPA'nın beyne geçişi ile birlikte OSB benzeri davranışlar gözlenmektedir. Bunun sonucunda beyinde nöroenflamasyon mikroglial aktivasyon ve miyelin kaybı gözlenmektedir.

Anahtar Sözcükler: CD68, Deneysel otizm modeli, GFAP, Nöroenflamasyon, Propiyonik asit

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Evaluation of Microglia Activation Neuroinflammation and Neuronal Loss Presence in Experimentally Generated Rat Autism Model with Propionic Acid

Sumeyye BASER

Department of Medical Microbiology

Consultants

Prof.Dr. Recep KESLI

Assoc. Prof. Dr. Ceyhan UGURLUOGLU

MASTER THESIS / KONYA-2020

Autism Spectrum Disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by behavioral disorders such as learning, speech and social skills, and sequential nonsense repeat movements. The etiology of autism is not known precisely. A decrease in the number of neurons and neuronal changes are observed in individuals. In line with the studies, it is emphasized that CD68 immune reactivity in autism is associated with microglia activation and glial fibrillar acidic protein (GFAP) immune reactivity with reactive astrogliosis. The study was conducted to determine the behavioral disorders and neuroinflammation that occurred in the model. A total of 25 rats, 20 of which were study and 5 were the control group were used.

The scores of the 20 rats in the study group were recorded by performing a behavioral test before and after creating an autism model. Then, the right ventricle area of 20 rats was fixed using a stereotaxy device. At this point, a single dose of propionic acid (PPA) (4 µl, 0,26 M solution) was administered from the right ventricle on the 10th day to the designated area. Hippocampus tissue was obtained after the sacrification process on the 21st day of the rats and examined. As a result of the behavior test, there is a statistically significant difference between the averages of before and after time ($p = 0,001 < 0,05$, $F = 22,978$). There is a statistically significant difference between the group averages in the Before-After * Day interaction ($p = 0,001 < 0,05$, $F = 69,820$). When the before and after groups were examined on a day basis, the difference with all days was found to be statistically significant ($p = 0,001 < 0,05$). According to the examinations, it was found that neurons in the cerebral cortex and hippocampal region (especially in the CA1 and CA3 regions of the primal layer) showed dystrophic changes with small, pycnotic and hyperchromatic nuclei. In the statistical comparison of the two groups, a significant decrease was observed in the CA3 primitive cell layer thickness of the study group ($P < 0,01$). It was found that the primidal cell numbers in this layer decreased statistically significantly in the study group ($P < 0,01$). In addition, it was determined that the density of these neurons increased (dark staining) due to uneven chromatolysis and abnormal distribution of Nissl granules.

No immunoreactivity that could be evaluated / scored in the neuropil tissues of the rats in both the control and study groups was found in the staining for CD68. It was determined that the number of GFAP positive cells, which is an important indicator of astrocyte expression, increased significantly in the cerebral cortex and hippocampal region in PPA applied rats ($P < 0,01$). As a result, PPA, a bacterial metabolite product, crosses the blood brain barrier. ASD-like behaviors are observed with the transition of PPA to the brain. As a result, neuroinflammation, microglial activation and loss of myelin are observed in the brain.

Keywords: CD68, Experimental autism model, GFAP, Neuroinflammation, Propionic acid

1. GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), her 59 çocuktan birini etkileyen ve yaşam boyu devam eden önemli bir sağlık problemidir. OSB genel olarak öğrenme, konuşma, sosyal becerilerde gerileme, ardışık anlamsız tekrar hareketler gibi davranış bozuklukları ve göz teması sağlayamama ile karakterizedir (MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Baio ve ark 2018, Reichow ve ark 2018, Vats ve ark 2018, Sharon ve ark 2019). Otizmin etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir, çocuklarda otizmin teşhisi için geçerli bir biyolojik belirteç veya biyolojik test mevcut değildir (Abrahams ve Geschwind 2008, Ameis ve Szatmari 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, OSB ile karakterize özellikleri ele alan hayvan modelleri oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bu modellerin deneysel olarak oluşturulmasında da valproik asit, lipopolisakkarit ve PPA gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır (Schneider 2005, El-Ansary ve ark 2011, Foley ve ark 2014, Foley ve ark 2014, Kirsten ve Bernardi 2017, Bilbo ve ark 2018, Choi ve ark 2018).

Bağırsak mikrobiyotasında yer alan çeşitli bakterilerin metabolik ürünleri arasında sindirilmemiş gıdaların fermantasyonundan ve fizyolojik seviyelerde bağışıklık ile ilişkili fonksiyonlar için gerekli olan yağ asidi metabolizmasından sorumlu kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) bulunmaktadır (Kasubuchi ve ark 2015). Bu yağ asitlerinin seviyelerindeki dengesizlik metabolik ve bağışıklık fonksiyonunu değiştirmekte ve OSB ile ilişkili davranışları şiddetlendirmektedir (Arpaia ve ark 2013). Ayrıca KZYA seviyesindeki artış bu yağ asitlerinin kan beyin bariyerini (KBB) geçmesi ile beyinde nöroenflamasyon, mikroglial aktivasyon ve astrosit artışına neden olmaktadır (Al-Lahham ve ark 2010, Arpaia ve ark 2013, Kasubuchi ve ark 2015).

PPA ve diğer KZYA (asetik asit, bütirik asit), nörotransmitter salınımı ve sentezi, sinapslar arası iletişim, lipit metabolizması, mitokondriyal fonksiyon, bağışıklık aktivasyonu ve gen ekspresyonu dâhil olmak üzere merkezi sinir sistemi fonksiyonunu etkilemektedir (Macfabe 2012, Koh ve ark 2016). Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda PPA'nın OSB ile potansiyel etkisi tespit edilmiştir. İntraserebroventriküler (i.s.v.) olarak uygulanan PPA, sosyal davranış ve etkileşimi bozduğu gözlenmiştir (MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, MacFabe ve ark 2011, Macfabe 2012).

Ratlara PPA'nın sistemik uygulanmasının kaygı ve sosyal etkileşim bozukluğu, buna bağlı olarak da beyinde glial hücre aktivasyonu tespit edilmiştir (Shams ve ark 2019).

Yaralanma, enfeksiyon veya hastalık sonucu nöroenflamasyon, glial hücrelerin (astrosit ve mikroglia) aktivitesi ve çoğalması meydana gelmektedir. Mikroglia ve astrositlerin morfolojik değişikliklere uğradığı ve bu patolojilere yanıt olarak birçok pro-inflamatuvar aracı salgılamaktadır (Hanisch ve Kettenmann 2007, Kierdorf ve Prinz 2013).

Bu aracılar öncelikle fizyolojik koşullar altında bağışıklığı koordine eden, nöronal fonksiyon ve bağlanabilirliği düzenleyen sitokinlerden ve kemokinlerden oluşmaktadır. Bu nedenle, artan mikroglia veya astrosit aktivitesi anormal bağışıklığa yol açmaktadır. Daha sonra nöronal sinyal ve bilişsel işlevi etkilemektedir. Astrositler ve mikroglia oldukça dinamiktir ve nöroenflamasyonu düzenlemeye ek olarak sinaps oluşumu, budama ve plastisite gibi homeostatik süreçlerde yer almaktadır (Matta ve ark 2019).

Bu proje ile ratlar da deneysel olarak otizm modeli oluşturularak mikroglia aktivasyonu, nöroenflamasyon ve nöronal kayıp varlıkları değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)

2.1.1. Tanım

OSB öğrenme, sosyal, dil ve konuşma becerilerinde bozukluk gibi belirtiler ile birçok sistemin etkilendiği erken dönemde ortaya çıkan ve ömür boyu devam eden bir nöro-gelişimsel bozukluktur (Muller ve ark 2004).

2.1.2. Otizm Spektrum Bozukluğu Tarihçe

18. yüzyılda Jan Itard ve Jon Hâlsam OSB davranış özellikleri incelemiş, bu bozukluğa sahip kişileri her hangi bir tanım koymadan farklı bireyler olarak tanımlamışlardır (Fazlioglu ve Baran 2008).

Yunanca'da 'otos' kelimesinden köken alan Otizm terimi dış dünyadan kendisini tümüyle soyutlayan bireyler için ilk kez 1911 yılında İsviçreli psikiyatrist Eugen Bleuler tarafından kullanılmıştır (Odom ve ark 2010).

" O amaçsızca gülüyor, parmaklarını havaya kaldırarak kalıplaşmış hareketler yapıyordu. Kafasını oradan oraya sallayıp aynı ses tonuyla bir şeyler mırıldanıyordu. Bunu büyük bir keyifle yapıyordu. Bir odaya konduğunda, insanları hiç önemsemeyip sallanıyor, nesnelere yöneliyordu. Hareketini önleyecek her adımı ve eli kızgınca itiyordu. " ifadesiyle beş yaşındaki bir erkek çocuğa ait gözlemlerini anlatan Leo Kanner, 1938 yılında otizmi ilk tanımlayan kişi olarak kabul edilmektedir (Kanner 1968).

Otizmli çocuklar ile ilgili araştırmalara ilk kez 1943 yılında Leo Kanner ile 1944 yılında Hans Asperger öncülük etmiştir. Kanner araştırmasına dâhil ettiği 11 çocukda kuvvetli hafıza, kelimeleri tekrar etme eğilimi, günlük hayatta değişikliklere karşı uyum gösterememe, yemek yemeye karşı zorluk, ses gibi uyaranlara karşı aşırı duyarlılık, sosyal ilişkilerde ve spontan aktivitelerde zorluk olarak belirtmiştir (Kanner 1968).

Şizofreni ile benzerlik göstermesi sebebiyle uzun süre çocukluk çağı psikozları arasında değerlendirilmiş, ayrı bir hastalık olup olmadığı tartışılmıştır. İlk kez Cappon şizofreni ve otizm arasındaki farklılıkları özetleyerek otizmin ilk tanı ölçütlerini belirlemiştir. Bu ölçütler daha sonra DSM (Diagnostic and Statistical Manuel Disorders) III ile otistik bozukluğu tanımına girmiştir (Cappon 1953).

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) ifadesi ilk kez 1979 yılında Wing ve Gould tarafından kullanılmıştır. Üç temel alanda (sosyallik, iletişim ve tekrarlayıcı davranışlar) yer alan belirtilerin farklı şiddetlerde ve şekillerde ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Wing ve Gould 1979).

Amerikan Psikiyatri Birliği 1980 yılında otizmi DSM-III'te ilk defa ayrı bir kategoride tanımlamış ve 1994 yılında daha detaylı olarak DSM-IV'de tanımlanmıştır (Baker 2013).

2013 yılında yayınlanan DSM-V ile 'Otizm Spektrum Bozukluğu' terimi resmi sınıflama sistemlerinde yer almıştır. DSM-V'te bu bozukluğun nöro-gelişimsel bir bozukluk olduğu, zekâ geriliğinin bu bozuklukla ifade edilmemesi gerektiği belirtilmiştir. Rett bozukluğu gruptan çıkarılarak otizm ve Asperger bozukluğu, başka şekilde ifade edilemeyen yaygın gelişimsel bozukluk olarak OSB başlığı altında toplanmıştır (Dunne ve ark 2020).

2.1.3. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanı Kriterleri

Otizm, atipik otizm ve Asperger bozukluğu üzerine çalışan uzmanlar bu üç terimi Otizm Spektrum Bozukluğu olarak bir tanı kategorisi altında kullanmasına rağmen 2013 yılında Amerika Psikiyatri Birliği tarafından yayınlanan DSM-V yayınlandıktan sonra resmi sınıflama sistemlerine girmiştir (Dover ve Le Couteur 2007).

2.1.4. Otizm Spektrum Bozukluğu Epidemiyoloji

OSB gelişimsel bozukluklar arasında en ön sıralarda yer almakta ve yayılma oranının giderek artması dikkati üzerine çekmektedir. Ayrıca günümüzde en sık rastlanan gelişimsel bozuklukların arasında yer almaktadır (Arneson ve ark 2009). Dünyada tüm kıtalarda ve insan ırklarında tespit edilmiş ve yıllar geçtikçe görülme olasılığının arttığı belirtilmektedir (Blumberg ve ark 2013).

Görülme sıklığı ülkelere ve ülkeler içinde eyalet/bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'de: %1,5-3, Güney Kore: %3, Japonya: %3, Türkiye'de kesin olmayan verilere göre %1, Avrupa genelinde %0,3-1 şeklindedir (MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Sharon ve ark 2019).

Otizmin etiyolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi söz konusudur. Etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik olarak yapılan klinik çalışmaların yetersiz

oluşu hastalığın etiyolojisinin anlaşılmasında sınırlamalara neden olmakta ve hastalık etiyopatogeneze ait gizemini korumaktadır (Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Yamawaki ve ark 2018, Sharon ve ark 2019).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) raporunda DSM ölçütlerinin esnetilmesiyle birlikte, hasta sayısında dramatik bir artış izlenmiştir (Fombonne 2009). 2001 yılında 1/250, 2007 yılında 1/150'de, 2009 yılında 1/110, 2012 yılında 1/68, 2014 yılında 1/59 OSB tanısı konulmaktadır (Christensen ve ark 2016). OSB kız çocuklarında daha ağır seyretmesine karşın erkek çocuklarında 1/189 oranında görülürken erkek çocuklarında 1/42 oranında görülmektedir (Christensen ve ark 2016).

Ülkemizde ise araştırmalara göre zorunlu eğitim çağında OSB tanısı alan çocuk sayısı 16,837 olarak belirtilmiştir. Ancak görülme oranı açısından kesin bir veri mevcut değildir. Ayrıca özel eğitim merkezlerin %53,2'si OSB'li çocuklara hizmet vermektedir (Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year Principal ve ark 2014).

2.1.5. Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyoloji ve Risk Faktörleri

OSB'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Yapılan araştırmalar doğum öncesi ve sonrası bireyin maruz kaldığı kimyasal etmenler, bulunduğu çevresel ortam, beyin gelişimini etkileyen faktörler, bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişiklikler gibi çeşitli faktörlerin OSB'ye neden olduğunu belirtilmektedir. Bu faktörlerinde sosyal iletişim, gelişimi bozukluğu, kısıtlı ilgi alanları ve tekrarlayıcı davranışlara yol açtığı ifade edilmektedir (MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Gupta ve ark 2018, Sharon ve ark 2019).

2.1.5.1. Nöroanatomik Faktörler

Günümüzde OSB nöroanatomisi için insan beyni ve OSB hayvan modelleri olmak üzere iki araştırma yöntemi kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar doğrultusunda mevcut bulgulara göre her birinin örtüşmesi sınırlamaları ve önemi belirlenmektedir (Kemper ve Bauman 2002, Varghese ve ark 2017). Beyindeki patolojileri ortaya koymak amacıyla ise elektro fizyolojik çalışmalar, beyin görüntüleme çalışmaları ve ölüm sonrası beyin incelemesi yapılmaktadır (Amaral ve ark 2008, Stanfield ve ark 2008).

Amigdala, frontal korteks, temporal lob ve serebellum en çok patolojik değişiklik bildirilen bölgelerdir (Bachevalier 1996). Değişiklik bildirilen bu bölgelerden amigdala, hipokampüs ve temporal lobda meydana gelen patolojik olaylar OSB'yi işaret etmektedir.

Ayrıca işitme ve iletişimde önemli role sahip parietal lob, birincil duyu korteksi ve bağlantı korteksi OSB'li bireylerde görevini tam yerine getirmemektedir. Bu da bireylerde pek çok sorunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Nagy ve Loveland 2002). Bebeklik döneminde medial temporal lob ve amigdala bölgesine hasar verilmiş deneysel hayvan modellerinde erişkinlik döneminde OSB ile benzer klinik bulgular tespit edilmiştir (Bachevalier 1996).

OSB'li bireylerde sağ ve sol planum temporalde anlamlı derecede gri madde kaybı da saptanmaktadır. Gri madde kaybının sonucu olarak bireylerde dil gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalarda özellikle sol hemisferde korteksin incelmesi, işitsel görsel alan gri madde artışı ve korpus kallosum hacminin azalması bildirilmektedir (Minshew ve Williams 2007).

Elektro fizyolojik çalışmalar ve beyin görüntüleme çalışmaları doğrultusunda bireylerin nöronal etkileşimde azalma nöron yapısında değişiklikler tespit edilmiştir. Ayrıca beyin hacminde %5-20 oranında artış, beynin yapısında genişleme gözlenmiştir (Abell ve ark 1999). 0-2 yaş arasındaki bireylerin %25-30'unda beyin hacminde hızlı bir artış, %20'sinde makrosefali gözlenmektedir (Holzel ve ark 2007).

OSB'li bireylerin ölüm sonrası beyinlerinin incelenmesi ile düzensiz gri ve beyaz cevher, nöron sayısında artış, purkinje hücre yoğunluğunda azalma ve artmış nöropil, dendritik uzantılar, serebral vaskülatür ve glia değişiklikleri tespit edilmiştir. Hem kortikal hem de kortikal olmayan alanlar, prefrontal korteks, fusiform girus, frontoinsüler korteks, singulat korteks, hipokampus, amigdala, serebellum ve beyin sapından bildirilen tutarlı bulgularla nöronal morfolojide bölgeye özgü anormallikler göstermektedir (Kemper ve Bauman 2002, Varghese ve ark 2017).

2.1.5.2. Nörokimyasal Faktörler

Nörotransmitterler bir olay ya da durum karşısında meydana gelen uyartıya karşı cevap olarak nöron ya da kas telini uyarmakta rol oynayan oluşan kimyasal maddelerdir. OSB'li bireylerde nörokimyasal bulgular, birden fazla nörotransmitter sisteminin tutulumuna işaret etmektedir. Serotoninerjik sistem, OSB'de yoğun bir şekilde araştırılmıştır, ancak diğer nörotransmitter sistemler de daha yakından incelenmektedir (Chugani ve ark 1996, Jack ve K 2017).

İnsan beyninde üç yaşına kadar önemli nöronal gelişimler, hücre aktiviteleri ve sinaptogenez görülmektedir. Bu süreçlere karşı oluşan anormal bir durum ile OSB

belirtilerinin ortaya çıkmaktadır (Lord ve ark 2018). OSB'li çocukların % 30-50'si olan anormal derecede yüksek seviyelerde serotonine sahiptirler (Penn 2006). Ancak seratonin seviyesinin yüksekliği ve dopamin ile yıkılan homovalinik asit beyin omurilik sıvısında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. İdrarda 3-metoksi-4-hidrofenilglikol düzeyinde azalma ile bağlantılı olan nöro-adrenerjik etkinliğin azalması da bildirilmiştir. OSB'li bireylerde hem beyin hacminde hem de nörotransmitter sistemlerinde anormallikler ve artmış serotonin, epinefrin, norepinefrin ve opioid düzeylerini gösterirken, azalmış oksitosin, glutamin seviyelerine işaret etmektedir. Bununla birlikte, OSB'de nörokimyasal ve endokrinolojik faktörler ele alındığında, farklı vakalar arasındaki büyük farklılıklar nedeniyle, genellemelerin yapılmasının zor olduğu olduğu görülmektedir (Plioplys ve ark 1990, Haznedar ve ark 1997). Bu nörotransmitter farklılıklarının beyin gelişimini etkilemiş olabileceği düşünülmekte, nörotransmitterlerle ilişkili ilaç tedavilerinin klinik iyileşme sağladığı görülmektedir (Chugani 2011).

2.1.5.3. Genetik Faktörler

Genetik faktörler aile ve ikiz çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. OSB aile ve ikiz çalışmalarında OSB'nin tek yumurta ikizlerinde görülme sıklığı (%60-%90) çift yumurta ikizlerinden (%0-%20) daha fazla olduğu şeklindedir (Barrett ve ark 1999, Liu ve ark 2001, Wassink ve ark 2004, Ylisaukko-oja ve ark 2004). Ancak, bazı ikizlerde epidemiyolojik kümelenme verileri bulunduğundan, bu faktör OSB etiyolojisinde çevresel faktörlerin de önemli olduğunu göstermektedir (Palomo ve ark 2003, Waltereit ve ark 2006). Ayrıca yapılan çalışmalar doğrultusunda OSB'nin erkek çocuklarda görülme sıklığı 3-4 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (Folstein ve Rosen-Sheidley 2001, Dawson ve ark 2002)

Yapılan kardeş çalışmalarında OSB'li çocukların kardeşlerinde genel populasyona oranla otizm riskinin 22 kat daha fazla olduğu; ayrıca hastalıktan etkilenmese bile bu çocuklarda kişisel-sosyal ve dil-bilişsel alanlarda gelişimlerinde güçlüklere daha sık rastlanıldığı bildirilmiştir (Lauritsen ve ark 2005, Orsmond ve Seltzer 2007).

Birden fazla bireyin etkilendiği ailelerle yapılan tüm genom tarama çalışmalarında ise birçok genin karşılıklı etkileşiminin OSB'ye neden olduğu gösterilmiştir. 5p14.1 ve 5p15 lokusunun genetik varyantları artmış risk teşkil etmektedir HLA bölgesi genlerinin araştırıldığı çalışmada HLA-B44, HLA-B57, HLA-DR4, HLA-DR14 ile otizm arasında ilişki olduğu kanısı oluşmuştur (Ma ve ark 2009, Weiss ve ark 2009).

Hastalıklar lokus ve allellikde heterojenite gösterdiği gibi eşik değerli multifaktöriyel kalıtım modeli ile de uygunluk göstermektedir (Cordeiro ve Vallada 2005). Ayrıca nöronal gelişim de beynin belli bölgelerindeki ve hücre tiplerindeki genler heterojenite göstermektedir. DNA'ya gelen emirler ile protein üretimi gerçekleşerek bu genlerin ekspersyonu da sağlanmaktadır (Naviaux ve ark 2017). Protein üretimi ile genlerin aktivitesi de beyin gelişimini etkilemektedir. Bu kapsamda OSB'nin etiyolojisinde genetik faktörler önemli rol oynamaktadır (Folstein ve Rosen-Sheidley 2001, Dawson ve ark 2002).

OSB genetiği ile ilgili kromozom anomalileri, genetik ilişki çalışmaları ve bağlantı çalışmaları sürmektedir. Hasta seçme kriterlerine bağlı olarak tercih edilen genetik belirteçler, genetik haritalama ve analizlerin farklılığından dolayı farklı sonuçlar bulunmuştur (Cordeiro ve Vallada 2005).

OSB'de 200'den fazla genin risk genleri olduğu ve oldukça fazla kromozom anomalisi bildirilmiştir. İlgili gen ve kromozomların beyin gelişimini veya bağışıklık sistemi yollarını etkilediği ile ilgili veriler mevcuttur (Pinto ve ark 2010, Hampson ve ark 2012). Bu genler çoğunlukla OSB'de ilerleme riski taşımaktadır. OSB yatkınlığı, OSB'li hastalarda ve ailelerinde; tek veya çoklu gen mutasyonları ve varyasyonlarının yanı sıra farklı kalıtım modlarını da içermektedir (Freitag 2007, Freitag ve ark 2010).

OSB'de bağışıklık bileşenine bağlı iki gen, kromozom 6 (6p21.3) da yer almaktadır. Bu genler, HLA0-DRB1 ve tamamlayıcı bileşen C4B olarak tanımlanmıştır. HLA0-DRB1 geni, OSB'de dil bozukluğu ile yüksek oranda ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Warren ve ark 1996, Nudel ve ark 2014). C4B plazmatik seviyesi düşük OSB'li bireylerde bağışıklık sistemi etkilenmektedir (Odell ve ark 2005).

Otizm ve bağışıklık regülasyonuna bağlı bir başka gen ise MET'dir. METC varyantı (7q31), kortikal gelişimin ve gastrointestinal olaylara karşı bağışıklık yanıtının negatif bir regülatörü olan bir reseptör tirozin kinazı kodlamaktadır (Campbell ve ark 2006, Fox ve ark 2012). MET'in hipomorfik mutasyonları, kortikal internöronun internöron progenitörlerinin gangliyonlarının kortekse anormal göçlerine neden olmaktadır (Campbell ve ark 2006, Freitag ve ark 2010). Ayrıca makrofaj inhibitör faktör geni için de gen ile otizmin şiddeti arasında bir korelasyon tanımlanmıştır (Grigorenko ve ark 2008).

OSB'de bazı genler beyin gelişimi ve bağışıklık ile doğrudan bağlantılı iken diğer genler ise çoklu kromozomlara bağlanmakta veya birden fazla biyolojik sürece dâhil olmaktadır (Abrahams ve Geschwind 2008).

OSB'li bireylerde kromozom çalışmalarında 8 kromozom bölgesi üzerinde durulsada birlikte (2, 3, 7, 11, 15, 17, 22, X kromozomları) %10-37 kromozomal anomali bildirmiştir. OSB patogenezinde nöronal sistem ile ilişkili olan genlerin büyük rolü olduğu düşünülmektedir (Gillberg ve Billstedt 2000, Yang ve ark 2010, Holt ve Monaco 2011, Miles 2011). GAT1 ve OXTR genleri kromozom 3, FOXP2, WNT2, RELN, HOXA1 ve HOXB1 kromozom 7, HRAS kromozom 11, GABRB3, GABRA5, GABRG3, UBE3A ve ATP10C kromozom 15, 5-HTT kromozom 17, MeCP2, NLGN3 ve NLGN4 kromozom X üzerinde yapısal farklılıklar belirlenmiştir (Maestrini ve ark 1999, Auranen ve ark 2000, Martin ve ark 2000, Persico ve ark 2001, Yirmiya ve ark 2001, Beyer ve ark 2002, Li ve ark 2002). Ayrıca CNTCNP2, CDH10, SHANK3, NRXN1 genlerinin mutasyonu da çeşitli kromozomlarda tespit edilmiştir. Otizmden sorumlu olabilecek postsinaptik yoğunluk, hücre adezyonu, sinaptogenezisde rolü olan EN2, MET, CNTNAP2, RELN gibi pek çok aday gende mutasyon olabileceği bildirilmektedir. Kopya sayısı değişkenliği olan SHANK3, NLGN4, NRXN1 ve DPP10 genlerinin de OSB' ye yatkınlığı arttırdığını gündeme getirmiştir (Gillberg ve Billstedt 2000, Yang ve ark 2010, Holt ve Monaco 2011, Miles 2011).

Geliştirilen yeni yöntemler ile son çalışmalarda OSB'li çocuklarda 1q24.2, 2q37.3, 3p26.2, 4q34.2, 6q24.3, 7q35, 13q13.2-q22, 15q11-q13, 15q22, 16p11.2, 17p11.2, 22q11 ve Xp22 kromozom bölgelerinde mikrodelesyonlar ve duplikasyonlar bildirilmiştir (Woodbury-Smith ve ark 2017).

OSB etiyolojisinde genetik faktörlerin çevresel faktörlerle etkileşime girerek bu bozukluğa zemin hazırlama durumu incelenen büyük bir sorundur. OSB için hayvan modellerinin geliştirilmesi, şüpheli çevresel ajanların etkilerinin kontrollü bir doz-tepki tarzında deneysel olarak incelenmesine gerekmektedir (MacFabe ve ark 2007).

2.1.5.4. İmmünolojik Faktörler

Beyin bağırsak bağlantısı beynin gelişiminde etkilidir. Nöronlarda hasarlı süreçlere katılır ve OSB gibi nöro gelişimsel bozukluklara katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda bağışıklık sisteminin OSB'li bireylerde davranışı ve bilişsel işlevleri düzenlediği bildirilmiştir. (Schwartz ve Kipnis 2011, Anthony ve ark 2012, Stolp ve ark 2013).

T lenfositleri, yabancı patojenlerin tanınmasını sağlamak için hücre yüzeylerinde antijene özgü reseptörler taşır ve sitokinlerin ana kaynağıdır. OSB'li bireylerde, B ve T lenfositler, NK hücrelerinin üretiminde ve işlevinde yetersizlikler mevcuttur (Ashwood ve ark 2011). CD4+ ve CD8+ olarak bilinen hücre yüzey moleküllerinin varlığı ile ayırt edilen

iki ana T lenfosit alt grubu vardır. CD4+'ü eksprese eden T lenfositleri, yardımcı T hücreleri olarak da bilinir ve bunlar, en üretken sitokin üreticileri olarak kabul edilir. Bu alt küme, Th1 ve Th2'ye daha da bölünebilir ve ürettikleri sitokinler, Th1 tipi sitokinler ve Th2 tipi sitokinler olarak bilinir. Thl tipi sitokinler, hücre içi parazitleri öldürmekten ve otoimmün yanıtları sürdürmekten sorumlu proinflamatuar yanıtlar üretme eğilimindedir. Aşırı proinflamatuar yanıtlar kontrolsüz doku hasarına neden olabilir, bu nedenle buna karşı koyacak bir mekanizma olması gerekir. Th2 tipi sitokinler, atopide IgE ve eozinofilik yanıtların artmasıyla ilişkili IL-4, IL-5 ve IL-13'ü ve ayrıca daha fazla anti-inflamatuar yanıta sahip olan IL-10'u içerir. Fazla miktarda Th2 tepkileri, Th1 aracılı mikrobisidal etkiye karşı koyacaktır (Gereda ve ark 2000, Jones ve ark 2000).

Bu kapsamda OSB'de Th2 yanıtı aktivasyonu dil, görsel ve motor beceriler, IL-4 öğrenme ve hafıza, IFN-γ ise sosyal ve mekansal öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilmiştir (Gadani ve ark 2012, Filiano ve ark 2016). Çocukların plazmasında yapılan araştırmalarda bağışıklık hücrelerinde işlev bozukluğu ve anormal düzeyde immünoglobulin ve sitokinleri içeren periferik bağışıklık tepkisi tespit edilmiştir (Ashwood ve Van de Water 2004, Suzuki ve ark 2011).

Bağışıklık hücreleri, sitokin seviyeleri, reseptörler üzerindeki varyasyonlar ve nöronal dokuların bakımı, bilişsel işlevler ve duygusal süreçler üzerinde derin bir etkiye sahiptir (Ashwood ve ark 2006). Bazı OSB'li bireylerde kronik bir Th1 pro-inflamatuvar sitokin yanıtı ve azalmış Th2 anti-inflamatuvar yanıtı meydana gelmektedir (Li ve ark 2009). Th1 / Th2 bağışıklık tepkisindeki bu dengesizlik, mikroglial ve astrogliyal hücrelerin aktivasyon sayısında ve durumunda artışa yol açmaktadır. Bu kapsamda pro-infamatuvar sitokin (IL-6, IL-1β, IL-8 ve IL-12p40) seviyelerinde bir artışa yol açmaktadır (Warren ve ark 1996, Pardo ve ark 2005, Vargas ve ark 2005, Ashwood ve ark 2006, Wei ve ark 2013, Wammes ve ark 2014). Aktif mikroglia ve astrogliyal aktivasyon INF-γ, MCP-1, TNF-α, MIF ve PDGF (Grigorenko ve ark 2008, Kajizuka ve ark 2010, Ashwood ve ark 2011) OSB'de nöroinamatöz süreçlerin belirteçleri olarak belirtilmektedir (Bacher ve ark 1998, Croonenberghs ve ark 2002, Vargas ve ark 2005).

Bireylerin beyin, serebral spinal sıvısı ve serumunda tipik bağışıklık tepkisi; belirgin bir astroglial ve mikroglial aktivasyon, Th1 / Th2 bağışıklık tepkisinde bir dengesizlik, IFN-γ, IL-1, IL-6, TNF-α ve kemokinler üzerinde MCP-1 olarak artış şeklindedir (Vargas ve ark 2005, Li ve ark 2009).

Doğal öldürücü T- hücreleri büyük ölçüde sitokinlere daha az yanıt vermesi ile OSB'de ilişkilendirilmiştir (Enstrom ve ark 2009, Siniscalco ve ark 2016). Aynı şekilde, plazmaya ait çalışmalarda, azaltılmış bilişsel ve uyarlanabilir fonksiyonlar gibi anormal davranışlarla ilişkili anti beyin otoantikorlarının varlığını ortaya çıkarmıştır (Goines ve ark 2011). Otoantikorlar, nöronal progenitör hücrelere karşı reaksiyona girerek merkezi sinir sistemi ve nöronal ölüm üzerinde etkilidir (Mazur-Kolecka ve ark 2014). Ek olarak, plazmatik IgG ve IgM düzeylerinde önemli bir azalma, ciddi otistik davranışlarla ilişkilendirilmiştir (Heuer ve ark 2008).

Sitokin seviyelerinde ve beyin omurilik sıvısında bozulmuş davranışlarla ilişkili olarak MCP-1, RANTES ve eotaksin kemokinleri plazmada yüksek seviyelerde belirlenmiştir (Ashwood ve ark 2011). Ayrıca, sPECAM-1 ve sP-selektin gibi adezyon molekülleri, OSB'li çocukların plazmasında önemli ölçüde azalmıştır. Bu bağlamda düşük sPECAM-1 seviyeleri anormal beyin fonksiyonları ile negatif korelasyonlu görünmektedir (Onore ve ark 2012). Periferik plazma örneklerinin değerlendirilmesi, yetişkin OSB'li erkeklerde bu eğilimi doğrulamıştır (Suzuki ve ark 2011).

MCP-1'in yanı sıra OSB'li bireylerden postmortem beyin ve beyin omurilik sıvısı üzerinde yapılan çalışmalar, TARC gibi bazı proinflamatuar kemokinler ve TGF-β1 yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Vargas ve ark 2005). Ancak yetişkinlerde (Okada ve ark 2007) ve şiddetli OSB davranış skorları olan çocuklarda periferik kanda kontrollere göre daha düşük TGF-β seviyeleri gözlenmiştir (Ashwood ve ark 2008). Önleyici bir hormon / sitokin olan plazmatik leptin seviyesi erken başlangıçlı OSB'li çocuklarda, regresif ve kontrol vakalarına kıyasla yüksek tespit edilmiştir (Ashwood ve ark 2008).

2.1.5.5. Çevresel Faktörler

OSB'de babanın yaşı, annenin gebelik sürecinde geçirdiği enfeksiyonlar, kimyasallara karşı maruziyet, sigara ve CO2'ye maruziyet, beslenme şekli gibi faktörler anne karnındaki bebeği olumsuz etkilemektedir. Gebeliğin birinci trimesterinde valproik asit, misoprostol ve talidomid kullanımı, beslenme yetersizlikleri, viral enfeksiyonlar; ikinci ve üçüncü trimesterlerde geçirilen bakteriyel enfeksiyonlar, D vitamin yetersizliği, annenin psikolojik durumu gibi dış etkenler, anne karnındaki bebeğin beyin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bu etmenlerin otizmle bağlantısının olduğu ifade edilmektedir. (Lawler ve ark 2004).

Doğum öncesi talidomid, valproik asit ve etanole maruz kalan çocuklarda OSB riskinin arttığı tespit edilmiştir (Arndt ve ark 2005). Bu gözlemler, doğum öncesi dönemde

kemirgenleri talidomid (Narita ve ark 2002) veya valproik aside (Ingram ve ark 2000) maruz bırakmaya dayanan bir dizi hayvan modelinin geliştirilmesine yol açmıştır. D vitamini beyin ve genler üzerinde etkisi belirlenmiştir. D vitamini oksidatif strese karşı DNA'yı koruması, DNA tamiri yapması ve OSB'de de nova mutasyonların sık görülmektedir. Bu nedenle D vitamini eksikliği OSB'deki rolü araştırılmaya değer görmüştür. (Yamashita ve ark 2003, Kinney ve ark 2010, Dietert ve ark 2011, Chomiak ve Hu 2013)

2.1.6. Otizm Spektrum Bozukluğu ve Bağırsak Mikrobiyotası

Mikroorganizmalara karşı fiziksel ve moleküler koruyucu mekanizmalar içeren insan vücudu aynı zamanda mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için en önemli bir yerdir. İnsanların çeşitli doku ve organları üzerinde yer alan bakteri, virüs, mantar, protozoa gibi mikroorganizmalardan oluşan ekosisteme 'mikrobiyota', mikroorganizmaların genomuna 'mikrobiyom' adı verilmektedir (Belkaid ve Hand 2014).

İnsan bağırsak mikrobiyotası yaşam boyunca birçok genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Sağlıklı bireylerde yaşamın ilk günlerinden ölüme kadar mikroorganizmalar faaliyetini sürdürmektedir. Bağırsak mikrobiyotası yaşamın ilk haftalarında daha az çeşitli olmasına karşın daha yüksek değişkenlik ile dinamik bir yapıya sahiptir. Yaş ilerledikçe çeşitlilik artar ve daha durağan hale gelir. Ancak geçirilen enfeksiyonlar, kullanılan ilaç ve antibiyotikler beslenme alışkanlıkları ve stres ile ciddi değişiklikler meydana gelmektedir. (Liu ve ark 2005, MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Yamawaki ve ark 2018, Sharon ve ark 2019).

Bağırsak mikrobiyotası, merkezi sinir sistemi ile çift yönlü bir etkileşim içinde 'ikinci beyin' görevi görür (Borre ve ark 2014). Nöropsikiyatrik hastalıklarda arttığı gösterilen pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, IL-18 gibi) sekresyonu bağırsak mikrobiyotası tarafından stimüle edilir (Maynard ve ark 2012, Petra ve ark 2015). Bütünlüğü bozulmuş bağırsak epitelyal hücrelerinden Lactobasillus gibi bazı mikroorganizmalar ile lipopolisakkaridler, serotonin, gamaaminobütirik asit (GABA) gibi mikrobiyota ürünleri geçip mukozal immün sistemi aktive ederek inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1β, IFN-γ, TNF-α gibi) salınımına neden olur. Beyinde vagotomi sonrasında immün yanıt azalmasının gastrointestinal sistem enfeksiyonu hayvan modelinde gösterilmesiyle bağırsak mikrobiyotası ile beyin arasındaki iletişimin vagal sinir yoluyla da gerçekleşebileceği saptanmıştır (Wang ve ark 2002). Enterik nöronların uyarılmasıyla salgılanan nöropeptidler ve hormonlar (dopamin, serotonin, GABA, KZYA gibi) vagal sinir yoluyla ya da kan-beyin bariyerini direk geçerek beyin fonksiyonlarını etkiler. Vagal sinir ve/ya da sitokinler tarafından hipotalamus

pitüiter adrenal eksen (HPA) in aktive olmasıyla salgılanan kortikotropin releasing faktör intestinal sitokin salınımını arttırarak bağırsak geçirgenliğini daha da arttırır (Yarandi ve ark 2016, Li ve ark 2017). Mikrobiyota triptofanın serotonin ve kinürenin yolaklarını etkileyerek kan-beyin bariyerini geçebilen son ürünlerin (kinürenik asit, quinolinik asit, serotonin) plazma düzeylerini değiştirip beyni etkileyebilir (O'Mahony ve ark 2015). Mikrobiyota bağırsak beyin ekseni hakkında bilgiler arttıkça nöropsikiyatrik bozukluklarda bağırsak mikrobiyotası araştırılmaya başlanmıştır. İki yönlü bu etkileşimin nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkisi, hastalığı önlemede ve tedaviyi düzenlemede rolü henüz netleşmemiş olsa da beyin ve bağırsak bir bütün olarak mikrobiyota bağırsak beyin ekseni olarak anılmaya başlanmıştır (Averina ve Danilenko 2017).

Bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen düzensizlikler, (de Magistris ve ark 2010, Borre ve ark 2014) tür zenginliği (Finegold ve ark 2002, Finegold ve ark 2010, Adams ve ark 2011, De Angelis ve ark 2013) ve bolluklarındaki değişimin, bağışıklık sistemini, belirli metabolik yolları, anormal davranışları (Hsiao ve ark 2013) ve hastalığın şiddetini kullanarak OSB semptomlarıyla doğrudan veya dolaylı olarak ilişkilidir (De Angelis ve ark 2015). Bu kapsamda OSB'li çocuklar genellikle tekrarlayan kulak enfeksiyonu, üst solunum yolu enfeksiyonları, çoklu ilaçlara karşı yan etki gösterme, hastalıkları uzun sürede atlatma, ve daha fazla bağırsak hastalığı prevalansı gibi bağışıklık ile ilişkili komorbiditelere sahiptir (Jyonouchi ve ark 2005, Nikolov ve ark 2009, Buie ve ark 2010, Coury ve ark 2012, Kohane ve ark 2012). Yaygın komorbid semptomlar arasında karın ağrısı, gazlanma, ishal veya kabızlık bulunur (Molloy ve Manning-Courtney 2003, Nikolov ve ark 2009). OSB tanısı alan çocuklarda kontrol grubuna kıyasla gastro intestinal sistemin geçirgenliğinde değişikliklere (geçirgen bağırsak) sahiptir (D'Eufemia ve ark 1996, de Magistris ve ark 2010). Bu özel durum, bakteriyel nöroaktif moleküllerin ve gastrointestinal antijenlerinin, kan dolaşımına etki eden beyin fonksiyonlarını etkileyen bağırsak mukozasını geçmesini sağlamaktadır (Li ve ark 2017). Ek olarak OSB'li bireylerde (de Magistris ve ark 2010, Heberling ve ark 2013, Borre ve ark 2014) ve deneysel otizm hayvan modellerinde bağırsak mikrobiyotası ve metabolik işlev bozuklukları değişmektedir (de Theije ve ark 2014).

Bağırsak mikrobiyotası incelenen OSB'li bireylerde şiddetli karın ağrısı, buğday ve süt ürünlerinin alınmasından kısa bir süre sonra çocuklarının davranışlarında kötüleşme olduğu bildirilmiştir (Jyonouchi ve ark 2002). Ayrıca OSB'de bağırsak motilitesinde değişiklikler, artmış geçirgenlik ve gluten veya kazein alerjisi olan hastalarda gözlenen bağırsak lezyonlarına benzeyen lezyonlar tespit edilmiştir (White 2003). Bu bireylerde refaks özofajit, gastrit, duodenit, azaltılmış karbonhidrat sindirim enzimleri, azaltılmış duodenal

paneth crypt hücreleri ve sekretine aşırı duyarlılık da tespit edilmiştir (Ingram ve ark 2000). Gastrointestinal şikâyetler ile başvuran OSB'li bireylerde serum analizlerinde mononükleer hücreleri, gliadin ve inek sütü proteinine yanıt olarak abartılı sitokin üretimi tespit edilmiştir. Bu bulgular, bazı hastalarda bazı diyet veya bağırsak kaynaklı faktörlerin beyin fonksiyonu ve semptomlarına neden olma merkezi sinir sistemi erişimine izin vermektedir (MacFabe ve ark 2007).

Bağırsak mikrobiyotası, besin ögeleri çoğunlukla karbonhidratlardan oluşmaktadır. Sindirilemeyen oligosakkaritler, sindirimden sızan karbonhidratların fermantasyonu *Bacteroides spp., Roseburia spp., Bifidobacterium spp., Faecalibacterium spp*. ve *Enterobacter spp.* gibi bakteriler sayesinde PPA, bütirik asit ve asetik asit gibi KZYA'nın sentezi ile oluşturulmaktadır. Bu yağ asitlerinin oluşumuyla ince barsak üzerinde pH düşmekte, *Enterobacter spp.* ve *Clostridium spp.* gibi patojen bakterilerin gelişimi önlenmektedir (Goffredo ve ark 2016). OSB belirtileri 36 aydan önce saptanabileceği gibi normal gelişim dönemini takiben 15-30 ay arasında da tespit edilmektedir (Barger ve ark 2013). Bu çocuklarda bağırsak mikrobiyotasının antibiyotik ile bozulmasıyla meydana gelen Clostridium toksini sonucu OSB belirtilerinin ortaya çıkabileceği hipotezi öne sürülmektedir (Sandler ve ark 2000). Dışkı incelemelerinde gastrointestinal sistem semptomları olan OSB tanılı çocuklarda *Clostridium spp.*'nin normalden 10 kat fazla ürediği belirtilmiştir (Finegold ve ark 2002). Clostridium ailesinin öbiyozis durumunda bağırsak mikrobiyotasında bulunan türleri toksin üretmezken OSB'de *C. bolteae* (Song ve ark 2004) ve *C. histolyticum* (Drakoularakou ve ark 2010) tarafından toksin üretildiği saptanmıştır. Clostridium'un ürettiği ekzotoksin ve propiyonatın otistik belirtileri arttığı düşünülmektedir (Frye ve ark 2015). Proteobakteria ailesinden gram negatif anaerobik bakteri olan *Sutterella spp*.'nin gastrointestinal sistem semptomu olan OSB tanılı çocuklarda yoğun olduğu (Williams ve ark 2012) başka çalışmalarda *Ruminicoccus torgues*'in yoğun (Wang ve ark 2013) *Prevotella spp*.'nin ise seyrek (Kang ve ark 2013) olduğu belirtilmektedir.

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında konsantrasyonunda artış göstren kalprotektin nötrofillerin yapısından bulunan antimikrobiyal, antiproliferatif ve kalsiyum bağlama özellğine sahip bir proteindir. OSB grubunda dışkıda granülosit kaynaklı bir protein olan kalprotektin artmış olarak gözlenmiştir (Gabriele ve ark 2016). Bu sonuçlar bağırsak geçirgenliğinin arttığını desteklemektedir. Bağırsak geçirgenliğinin artmasıyla dolaşıma giren maddelerin hangi mekanizmayla OSB ile ilişkili olabileceği araştırılmıştır. Sızdıran bağırsak hipotezinde kan dolaşımına geçen bakteri kökenli lipopolisakkaritlerin immünolojik ve

inflamatuvar sistemi aktive ederek sistemik pro-inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olduğu öne sürülmektedir (Qin ve ark 2007).

Fenol ve p-kresolün vücuttan atılması için ilk olarak bağırsak mikrobiyotası (*C. difficile, P. stutzeri*) tarafından metabolize edilmesi gerekmektedir. Sızdıran bağırsak hipotezine göre metabolize edilmeden kan dolaşımına geçen fenol ve p-kresol nörotoksik etki gösterir (Gabriele ve ark 2014) tarafından yapılan bir çalışmada özellikle 7 yaşından küçük kızlarda OSB belirti şiddeti ile p-kresol seviyesi arasında ilişki saptanmıştır. Karaciğerde ilaçları inaktive eden sülfatazlarla p-kresol'un yarışmaya girerek (kompetatif inhibisyon) ilaç farmakokinetiğini değiştirdiği, OSB'de ilaç yan etkilerini ve toksisite riskini arttırabileceği düşünülmektedir (Altieri ve ark 2011). Otizmde p-kresol seviyesi ile bağırsak geçiş süresi ve kronik konstipasyon arasında ilişki olduğu belirtilmektedir (Gabriele ve ark 2016).

Gelişen teknoloji ve araştırmalar çerçevesinde bağırsak mikrobiyotasını hedef alan tedavi yöntemleri de mevcuttur. Fekal mikrobiyota transferi de tercih edilen ve olumlu sonuçların gözlendiği bir tedavi yöntemidir (Bagdasarian ve ark 2015). İnsanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda OSB'li çocuklara, sağlıklı kontrol grubu çocuklardan elde edilen gaita örnekleri çeşitli ön işlemlerden geçirildikten ve hazırlık işlemleri tamamlandıktan sonra kolonoskopi ile terminal ileuma transferi gerçekleştirilmiştir. 2017 yılında, 18 OSB'li çocuğa, mikrobiyota transfer terapi ve fekal mikrobiyota transferi uygulanmıştır. Gastrointestinal Semptom Ölçüm Skalası'na göre, gastrointestinal semptomlarda (kabızlık, diare, hazımsızlık, karın ağrısı) % 80 azalma görülmüş ve otizm semptomlarında anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Ayrıca semptomlardaki iyileşmenin, 8 hafta devam ettiği belirlenmiştir. Transfer sonrası bağırsak mikrobiyom çeşitliliğinde; *Bifidobacterium spp.* (4 kat), *Prevotella spp.* (712 kat), ve *Desulfovibrio spp.* sayısında artış olduğu belirtilmektedir (Kang ve ark 2017). Daha sonra çalışmanın 2 yıllık izlem sonuçları doğrultusunda transfer sonrası mikrobiyom çeşitlilik ve sayı artışının, gastrointestinal ve otizm davranış semptomlarındaki iyileşmenin devam ettiği, otizmli çocukları tedavi etmek için uzun dönemde güvenli ve etkin, potansiyel bir tedavi yöntemi olduğu vurgulanmaktadır (Kang ve ark 2019). Bu çalışmaya benzer şekilde mikroorganizma içermeye steril dişi fareler ile yapılan deneysel hayvan modellemesinde OSB tanılı çocuklardan alınan gaita örneklerinin hazırlık işlemleri yapıldıktan sonra oral gavaj ile dişi mikroorganizma içermeye steril fare grubuna transfer gerçekleştirilmiş, bu grubun gebe kalması sağlanmış ve doğan bebek fareler için uygulanan 3 farklı davranış testleri skorları neticesinde tamamının OSB ile karakterize davranış ve çalışma sonuçları elde edilmiştir. Yine aynı çalışmadan normal gelişim gösteren çocuklardan elde edilen örneklerin ön hazırlık işlemelerinden sonra transferi ile bu grubun gebe kalması

sonrasında doğan bebek farelerin tamamının sağlıklı gelişim gösterdiği belirtilmektedir (Sharon ve ark 2019).

2.1.7. Deneysel OSB Hayvan Modelleri

Deneysel hayvan çalışmalarında esas amaç; insan ve hayvan sağlığında anlaşılması zor mekanizmaları çözümlemek, organizasyon ilişkisini anlamak ve hastalıklara tanı koyup tedavi etmek için yöntemler üretmektir. OSB'nin insan üzerinde etiyopatolojisini ve uygun tedavi yöntemlerini çalışmak zordur. Bu nedenle deney hayvan modelleri tercih edilmektedir (Watts 2007).

Mikroorganizmasız (germ free (GF)) farelerin 1959'da elde edilmesiyle mikrobiyotanın vücutta her sisteme etkisi olduğu saptanmıştır (Wostmann 1981). GF farelerde HPA ekseninde stres tepkisi fazladır ve bağırsak mikrobiyatasındaki bir bakteri ile kolonizasyonu sonrasında bu durum düzelmektedir. Burada bağırsak kolonizasyonun beyin plastisitesine etkisi söz konusudur (Sudo ve ark 2004). Mikrobiyotada meydana gelen değişiklikler sonucunda endotelyal sıkı bağlantı moleküllerini (occludin, claudin-5) etkiler. Bunun sonucunda farelerde KBB geçirgenliği değişmektedir. (Braniste ve ark 2014).

2014 yılında bir çalışmada yapılan davranış testlerine göre GF farelerin boş bölmeyi, normal farelerin ise içinde başka bir farenin olduğu bölmeyi tercih etmiştir. GF farelerde bakteriyal kolonizasyon ile tersine çevrilmesiyle mikrobiyotanın sosyalleşme davranışlarına etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmanın devamında yabancı farelerin olduğu bölmede normal farelerin daha uzun, GF farelerin ise daha az zaman geçirdiğinin gözlenmesi, GF farelerin sosyalleşme isteklerinin az olması olarak yorumlanmıştır. Böylece mikrobiyotanın OSB'deki rolünün araştırılabileceği fikri doğmuştur (Desbonnet ve ark 2014). Bu farelerin beyinlerinde amigdala ve hipokampüs başta olmak üzere morfolojik değişiklikler mevcuttur. Bağırsak mikrobiyotasının cAMP-aracılı sinyalizasyon, sitrat siklusu ve sinaptik uzun-etkili potensiyeli gibi temel yolaklarda rol almaktadır. Serotonin, glutamat, dopamin gibi moleküller aracılığıyla nöronal iletişime dâhil olduğu ve tüm bunların hayvanda sosyalleşme davranışlarını etkilediği düşünülmektedir (Needham ve ark 2018).

Fare yavrularına gestasyon sürecinde polisitidilik acid (polyl: C) gibi bir immünojen verilerek maternal immün sistem aktivasyonu (MİA) oluştrulmaktadır. Bu bağlamda fare yavrularında OSB benzeri belirtilerin görülmektedir (Hsiao ve ark 2013).Yapılan analizler doğrultusunda yavrularda bağırsak geçirgenliğinin ve bağırsak kökenli metabolitlerin (4-etilfenilsülfat, indolpirüvat, serotonin) artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Clostridia

sınıfından Lachnospiraceae'nin artmış olduğunu ve bağırsak mikrobiyotasında disbiyozis varlığı belirtilmektedir. Meydana gelen disbiyozis sonucu farelere probiyotik olarak *B. fragilis* verilmesiyle bu bulguların ve OSB benzeri davranışların azaldığını göstermişlerdir (Hsiao ve ark 2013) Ek olarak sızdıran bağırsak durumunda dolaşıma katılan pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın inhibisyonu MİA modelinde davranışları düzelttiği bildirilmektedir (Smith ve ark 2007).

Maternal diyetle yapılan OSB hayvan modelinde probiyotik olarak *L. reuteri* kullanılmasıyla sosyalleşmenin düzeldiği belirtilmektedir. Ventral tegmental alanda azalmış olan oksitosin reseptör miktarının normalleştiği (Buffington ve ark 2016) ve ayrıca *Citrobacter rodentium*'un anksiyeteyi azalttığı, bir başka çalışmada ise penicilin ile değiştirilen bağırsak mikrobiyotası sonucunda bozulan sosyalleşmenin *L. rhamnosus* JB-1 ile düzeldiği (Bagarolli ve ark 2017) gösterilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası kaynaklı bir peptidoglikan-sensin molekül Pglyrp2'nin bloke edilmesi OSB risk genlerinden olan c-Met ekspresyonunu ve sosyalleşme davranışlarını etkilemektedir (Arentsen ve ark 2017).

Shank 3 knock-out mutant farelerde *L. reuteri* sayısının azalmasına bağlı olarak oluturulan OSB modelinde beyinde GABA reseptörlerinin miktarını değiştiği ifade edilmektedir. Probiyotik olarak *L. reuteri* verilmesiyle bu durumun değişmesi ve OSB belirtilerinin azalması, probiyotik tedavisinin sadece çevresel değil genetik nedenli OSB belirtilerini de azaltabileceğini düşündürmektedir (Tabouy ve ark 2018).

Clostridium spp. , Bacteroidetes spp. ve *Desulfovibrio spp*. tarafından üretilen PPA'nın i.s.v. uygulanmasıyla farede (Thomas ve ark 2012) ve sıçanda OSB benzeri belirtiler ortaya çıkmaktadır. Whey-proteine duyarlı alerjik farelerde bağırsakta IgE aracılı immün yanıtın başta serotonin olmak üzere çeşitli molekülleri artırmasıyla OSB benzeri belirtilere neden olduğu gösterilmiştir (de Theije ve ark 2014).

m-Tirozin beyinde katekolamin boşalmasına yol açarak hayvanda OSB benzeri belirtilere neden olmaktadır (Dyck ve ark 1982). *Clostridium spp.* aracılığıyla üretilen m-tirozin analoğu olan 3-(3-hidroksifenil)-3-hidroksipropionik asit (HPHPA) ise OSB hayvan modellerinden bir diğeridir (Shaw 2010).

Doğuştan korpus kallosumu olmayan ve hipokampal komissürü çok ince olan (Wahlsten ve ark 2003), OSB benzeri belirtiler gösteren (Moy ve ark 2007) bir soy olan BTBR (Black and Tan Brachyury) farelerinde de bağırsak geçirgenliği artmış durumdadır (Coretti ve ark 2017).

KZYA'lardan biri olan PPA KBB'yi geçebilen bakteri metabolitidir. Beyne i.s.v. enjeksiyonu sonucunda deneysel olarak OSB modeli oluştrulmaktadır. Bu doğrultuda 74 *Long evans* erkek sıçana i.s.v. PPA verilmiştir. Sıçanlardan alınan beyin dokusunda biyokimyasal ve immünohistokimya analizleri yapılmış, oksidatif stres belirteçlerinde (lipid peroksidasyon ve protein karbonilasyon) ve glutatyon S-transferaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Buna ek olarak glutatyon ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde bir azalma meydana gelmiştir. Hipokampüs ve bitişik beyaz maddeinin nörohistolojik incelemelerinde, ise artmış glial fibriler asidik protein (GFAP) immünoreaktivitesi ve aktifleştirilmiş mikroglia (CD68 immünoreaktivitesi) tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan incelemeler doğrultusunda kaspaz 3 immünoreaktivitesi ve fosforile CREB immün reaktivitesin de artış belirtilmiştir (MacFabe ve ark 2007). Benzer bir çalışmada 114 yetişkin erkek Long evans cinsi sıçanda deneysel OSB modeli oluşturulmuştur. Beyin dokuları alınan sıçanların immünohistokimyasal analizi ile nöroenflamatuvar yanıt gösteren reaktif astrogliozis tespit edilmiştir (Shultz ve ark 2008). Bilişsel ve motorik aktiviteyi değerlendirmek için 50 adet sıçana PPA i.s.v. olarak verilmiştir. Sıçanların beyin dokusu nöroenflamasyon oluştuğu tespit edilmiştir (Shultz ve ark 2009). i.s.v. olarak PPA ile oluşturulan deneysel OSB modelinde 47 adet yetişkin erkek Long Evans cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlardan alınan beyin dokusunun immünohistokimyasal analizi, reaktif astrogliyoz ve aktive edilmiş mikroglia gösterdi, bu da doğuştan gelen bir nöroinflamatuar yanıtı göstermiştir (MacFabe ve ark 2011).

2.2. Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA)

KZYA olarak bilinen asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asit gastrointestinal sistemin üst kısmında sindirilmeyen karbonhidratları bakteriyel fermentasyona uğraması sonucu oluşan çeşitli bileşiklerdir. Vücuda az da olsa süt ile alınan KZYA bulundukları mukozal membranı uyararak mukozal membranın büyümesinde oldukça önemlidir (Giovannini ve ark 1991, Roche ve Siervogel 1991). KZYA oluşumu için dirençli nişasta, nişasta olmayan polisakkaritler (diyet posası), şeker alkolleri, oligosakkaritler, diyet proteini, pankreatik enzimler ve diğer gastrointestinal salgılar, üre, nitrat ve mukus, insan kolonunda gerekli en önemli substratlardandır (Roche ve Siervogel 1991).

Anne sütüyle beslenen bebeklerin kolonlarında bakteriyel yıkım sonucu miktarı artmış olan KZYA'lar ince barsakta tamamen sindirilmeyen laktozdan oluşmaktadır. Yetişkinlerde yapılan çalışmalarda KZYA'ların kolonda temel enerji kaynağı olarak belirtilmiştir (Giovannini ve ark 1991). Asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asitin epitelyal hücre

üretiminde uyarıcı etkinlikleri bütirik >propiyonik >asetik asit şeklindedir. KZYA'ların molar oranlarındaki değişiklikler epitelyal hücre üretim oranını değiştirmektedir. Kolon için en önemli enerji kaynağı bütirik asit kolon hücrelerini beslemekte ve kan akımı, oksijen alımını ve çeşitli maddelerin (su, sodyum vb.) emilimini uyarmaktadır (Roche ve Siervogel 1991).

İnsan mikrobiyotası patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleme, immün sistemi destekleme işlevlerinin yanı sıra bulundukları habitata özgü işlevler de gösterirler. Bağırsak mikrobiyotası K vitamini sentezini, KZYA üretimini ve intestinal bariyerin devamlılığını sağlar (Backhed ve ark 2005). Galaktooligosakkarid ve fruktooligosakkaridlerin bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilmesi sonucunda KZYA açığa çıkar. Laktik asit ve süksinik asit KZYA öncülleridir. Hızla emilen KZYA'nın ancak %5'i dışkıda bulunur. En fazla üretilen asetik asit olurken kolonik epitel hücrelerinin başlıca enerji kaynağı olan bütirik asit bağırsak inflamasyonunu da engellemektedir. Ayrıca vücut homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan nöropeptidlerin salınımı GPR43 ve GPR41 reseptörlerine bağlanan KZYA ile olmaktadır. Nöropeptidlerin salınımında rol oynana KZYA enteroendokrin sinyal yolağı ile enterik sinir sistemi üzerinde de rol oynamaktadır. Bununla birlikte kan beyin bariyerini geçebilen KZYA, insan genomunda histon asetilasyonu, G protein reseptörlerinin ligandları üzerine etkilidir (Koh ve ark 2016)

2.2.1. Propiyonik Asit (PPA)

Kalın bağırsak da yer alan anaerob bakteriler adeta bir organ işlevi görerek enzimler aracılığı ile sindirilemeyen polisakkaritlerin fermantasyonu ile kısa zincirli yağ asitlerini oluşturmaktadır. *Bacteroides, Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteriler asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asitlerin oluşumunda önemli rol oynayan bakterilerdir (Backhed ve ark 2005, O'Hara ve Shanahan 2006). PPA, bağırsakta yüksek seviyelerde bulunan hücresel yağ asidi metabolizması olarak enterik bakterilerin metabolik son ürünü olan bir kısa zincirli yağ asididir (Jan ve ark 2002). Ayrıca propiyonibakteriler laktik asit ve karbonhidratları propiyonik asit, asetik asit ve karbondioksite çevirmesi yeteneğiyle endüstriyel üretimde önemli bir rol oynamaktadır (Ohshima ve ark 1985).

2.2.2. Propiyonik Asit ve Otizm Spektrum Bozukluğu

PPA ve diğer KZYA' nın seviyesindeki artış OSB'de gözlenen davranışsal bozukluklar gelişimsel gecikme, nöbet, gastrointestinal semptomlar, nöropatolojik ve biyokimyasal anormalliklerde rol oynamaktadır (Burlina ve ark 1999, Wajner ve ark 2004).

Bu nedenle PPA, diyet veya enterobakteriyel olarak türetilmiş metabolitler arasında etkili bir bağlantı olduğu bilinmektedir (MacFabe ve ark 2007).

Zayıf bir organik asit olan PPA, bağırsak-beyin ve kan-beyin bariyerleri dâhil olmak üzere lipit zarlarını kolayca geçmektedir. Ayrıca fizyolojik pH'da iyonize ve iyonize olmayan formları bulunmaktadır (Karuri ve ark 1993). Ek olarak, PPA ve ilgili KZYA, bağırsak lümeni (Tamai ve ark 1995) ve serebrovasküler endotelyumdaki (Bergersen ve ark 2002) monokarboksilat reseptörleri tarafından alınmaktadır. Özellikle erken beyin gelişimi sırasında beyin metabolizmasında önemli bir enerji kaynağı içerdiği düşünülen nöronlar ve glia (Peinado ve ark 1993, Maurer ve ark 2004) tarafından da alınmaktadır (Rafiki ve ark 2003).

Asetik asit ve bütirik asit ile birlikte PPA, terminal ileum ile doğrudan teması sonucu gastrik motiliteyi azalttığı ve kasılma sıklığını arttırarak gastrointestinal sistem üzerinde doğrudan etkisi vardır (Cuche ve Malbert 1999). Ek olarak, PPA kolon düz kasının kasılmasını arttırmakta (McManus ve ark 2002), kolon arterlerini genişletmekte (Mortensen ve ark 1990), mast hücrelerini aktive etmekte (Tazoe ve ark 2008) ve bağırsak enterokrofin hücrelerinden serotonin salınımını arttırmaktadır (Mitsui ve ark 2005). Bu nedenle PPA, normal gastrointestinal peristaltik aktiviteye müdahale ederek OSB'li bazı bireylerde gözlenen gastrointestinal sistemde bozukluğa yol açmaktadır (Horvath ve ark 1999). Gastrointestinal sistemde artan sistemik PPA düzeylerinin merkezi sinir sistemini etkileme şekli bilinmemektedir. İn vitro ve hayvan çalışmaları, artan PPA seviyesi ile Na +, K + -ATPaz aktivitesi (Wyse ve ark 1998), N-metil D-aspartat reseptör aktivitesi (de Mattos-Dutra ve ark 2000), sitoiskeletal fosforilasyon (de Almeida ve ark 2003), hücre içi kalsiyum seviyeleri (Nakao ve ark 1992), reaktif oksijen ve azot türlerinin atılması (Jan ve ark 2002, Bavaresco ve ark 2004) ve boşluk bağlantılarının modülasyonu gibi çeşitli süreçleri etkilediğini göstermektedir (Rorig ve ark 1996).

Artan PPA seviyesi ile etkilenen hücresel metabolizma oksidatif fosforilasyonun doğrudan inhibisyonu yoluyla mitokondriyal fonksiyonun ayrılmasıdır (Brass ve Beyerinck 1988). Diğer etkiler arasında karnitinin sekestrasyonu (Brass ve Beyerinck 1987) ve kısa zincirli yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonuna yol açabilecek propiyonil koenzim A seviyelerinin arttırılması yer almaktadır. Yüksek PPA ayrıca, diğer çevresel toksik faktörlerin veya bulaşıcı ajanların neden olduğu hasarın artmasına neden olabilecek oksidatif strese duyarlılık üretmektedir (Wajner ve ark 2004). Yüksek PPA ayrıca interferon IFN-γ gibi proinfamatuvar sitokinlerin spesifik olarak polimorfonükleer lökositler üzerindeki KZYA'ya doğrudan aktivasyonu yoluyla bağışıklık fonksiyonunu modüle etmektedir (Cavaglieri ve ark

2003). Bu reseptörlerin aktivasyonu, hücre içi kalsiyum seviyelerinde ve hücre hareketliliğinde, bağışıklık hücrelerinin sindirim sistemi gibi PPA seviyelerinin yüksek olduğu bölgelere göçünü teşvik edebilecek değişikliklere yol açar (Brunkhorst ve ark 1992, Le Poul ve ark 2003). Bununla birlikte, PPA ile benzer bir bağışıklık sistemi aktivasyonunun merkezi sinir sisteminde meydana gelip gelmediği bilinmemektedir (Brunkhorst ve ark 1992).

İn vitro çalışmalardan elde edilen kanıtlar, bağırsak (DeSoignie ve Sellin 1994), bağışıklık sistemi (Brunkhorst ve ark 1992) ve merkezi sinir sistemindeki (Rorig ve ark 1996) çeşitli hücrelerin, hücre dışı asidifikasyona yol açan PPA ve diğer zayıf organik asitleri konsantre edebileceğini düşündürmektedir. Hücre dışı ek pH azalmalarıyla alevlenebilecek bir fenomeni konsantre edebileceği de öngörülmektedir (Karuri ve ark 1993).

PPA ilginç bir etkisi, muhtemelen hücre içi asidilasyonu indükleyerek (Rorig ve ark 1996, Fujita ve ark 1998), boşluk bağlantılarının kapatılması yoluyla hücreler arası elektrotonik birleşmeyi geri dönüşümlü olarak azaltmaktadır. PPA tarafından yükseltilen bir dizi faktörle açılan konneksin proteinlerinden oluşan boşluk kavşakları, dopamin (Schorderet ve Nowak 1990, Rorig ve ark 1995, Velazquez ve ark 1997), kalsiyum (Perez-Velazquez ve ark 1994), nitrik oksit (Nicot ve ark 2004) ve sitokinler d (Kielian ve Esen 2004) hücreler arası kanallardır (LeBeau ve ark 2003). Boşluk bağlantı kavşağı nöral elektriksel aktivitenin ayrık fonksiyonel gruplarla senkronizasyonu için ayrılmazdır (Peinado ve ark 1993). Ek olarak, glutamat ve potasyumun alınması ve hücreler arası difüzyonu ile artan metabolik stres dönemlerinde nöronları koruyan fonksiyonel bir nöroprotektif sinsiyum oluşturan gliyal hücreler arasında boşluk bağlantıları vardır (Anders 1988, Reuss ve Unsicker 1998, Perez Velazquez ve ark 2003). Boşluk kavşak iletişimi, bazal gangliyonlar (O'Donnell ve Grace 1997), prefrontal korteks (Rorig ve ark 1995), çekirdek akümülatörleri (O'Donnell ve ark 1999) ve hipokampüs (Rorig ve ark 1995, Moore ve Grace 2002) dâhil olmak üzere nöbet gelişimi ve hareket bozukluğu ile ilişkili alanlarda nörotransmisyonda yer alır. Karbenokselon ve anandamid gibi bilinen boşluk bağlantısı bloke edici ajanların kontrastlı enjeksiyonları, stereotipik hareketler üretir, kemirgenlerde motor diziliminin hareketini ve bozulmasını arttırır (Moore ve Grace 2002). Gap-kavşak bağlantısı üzerinde yapılan ek çalışmalar, anormal beyin gelişimi, nörotoksikin hastalıklarına karşı agresif tepkiler ve anormal davranışlar göstermiştir(Fushiki ve ark 2003).

Clostridia, PPA ve diğer KZYA'nın üreticisidir. *Clostridium difficile*'nin psödomembranöz kolit gibi ciddi gastroenterolojik hastalıkların ana nedeni olduğu

bilinmektedir (Stackebrandt ve ark 1997), ancak hem doğum öncesi hem de doğum sonrası antibiyotikle ilişkili ishalin önemli bir nedenidir (Ferreira ve ark 2003). Bu patojenin, mukozal hasar ve lenfosit ve sitotoksin B yoluyla gastrointestinal semptomlardan sorumlu bir enterotoksin A ürettiği de bilinmektedir. Bununla birlikte, bu bağırsak patolojisinin üretildiği kesin mekanizma bilinmemektedir (Ferreira ve ark 2003). Antibiyotiğe dirençli klostridiyal suşlar yetişkin hastalarda çok çeşitli hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda (McDonald ve ark 2005) rol oynar, ancak antibiyotik tedavisine bağlı pediatrik diyarede rolleri kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır. Özellikle klostridiyal türlerden spor oluşturan anaerobların ve mikroerofilik bakterilerin geç başlangıçlı OSB'li çocuklarda arttığı, ancak kontrollerde bulunmadığı gösterilmiştir (McDonald ve ark 2005). Ayrıca, regresif OSB'si olan hastalardan alınan dışkı örneklerinin PZR analizlerinde *C. difficile* de dâhil olmak üzere klostridiyal türlerde artışlar ortaya çıkmıştır (Song ve ark 2004). Patojenin oral vankomisin tedavisi ile ortadan kaldırılması, bazı hastalarda iyileşmiş semptomlar olarak görülmektedir. (Borgstrom ve ark 2000, Jan ve ark 2002, Zouboulis ve ark 2005).

Hücre adezyon proteinleri, mitokondriyal hücreler, nörotransmitter sistemleri, immün hücreler gibi OSB ile ilgili genlerin ekspresyonunda rol alan PPA'nın fazlası MSS'yi etkilemektedir (Nankova ve ark 2014). Bir çalışmada OSB'de KZYA'nın (özellikle PPA) ve amonyağın dışkıda fazla oranda olduğu saptanmıştır; ancak kandaki düzeylerine bakılmadığı belirtilmiştir (Wang ve ark 2012). Disbiyozis, sülfür metabolizması bozukluğu ve oksidatif stresin, kısır döngüye girerek birbirlerinin etkilerini arttırdıkları hipotezi de öne sürülmüştür (Heberling ve ark 2013).

2.3. Nöroenflamasyon

Nöroenflamasyon sinirsel yapıda bir hasar durumunda hasardan etkilenen hücreleri yok etmekte ve hasar gören ekstraselüler matriksi onaran nöronal tepkidir. Nöroenflamasyon sinirsel yapıda meydana gelen enfeksiyon, kronik hasar, zaralı metabolitler gibi nedenlere karşı yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Meydana gelen enflamatuvar yanıt ile beyin dokusu, hasara karşı savunma oluşturmakta ve daha az zarar görmektedir. Akut inflamasyonda inflamatuvar moleküller, endotel hücre aktivasyonu, trombosit birikimi ve doku ödemi gözlenmektedir. Kronik inflamasyon ise glial hücrelerin uzamış aktivasyonu ve immün hücrelerin katılması gerçekleşmektedir (Ong ve ark 2010).

2.3.1. Kan Beyin Bariyeri (KBB)

KBB, yüksek geçirgenliğe sahip olarak kan ile merkezi sinir sistemi içindeki sıvıyı birbirinden ayırmaktadır. Bu yapı sıkı bağlantılar ile birbirine bağlanmış endotel hücreler tarafından oluşturulmaktadır KBB'yi meydana getiren önemli elemanlar kapiller damarların endotel hücreleri, perisitler, astrositler, bazal membran, koroid pleksus ve pia-araknoid zarlardır (Li ve ark 2001, Engelhardt 2003).

KBB, su, çeşitli gazlar, yağda çözünebilen ve hidrofobik yapıdaki maddelerin pasif difüzyonla geçişine izin verirken (Hasselbalch ve ark 2001) hidrofilik yapıdaki maddeler, büyük moleküller, birçok mikroorganizmanın ve nörotoksin maddenin geçişine izin vermez. Astrositler KBB'nin oluşumunda ve işlevlerini yerine getirmede astrositler oldukça önemlidir. Ayrıca KBB'nin üstünde kılcal damarlar ile birlikte sıkı bağlantılar mevcuttur. KBB'deki hücreler glikoz gibi metabolik ürünleri aktif taşıma yaparak almaktadırlar (Huber ve ark 2001).

2.3.2. Mikroglia Hücreleri

Mikroglia beynin %10-15'ini oluşturan ve merkezi sinir sisteminde yer alan glial hücrelerdir (Careaga ve ark 2010). Meydana gelen yangı ya da hasar doğrultusunda makrofaj hücreleri işlev görmektedir (Onore ve ark 2012). Beyinde meydana gelen olumsuz durumda pasif durumdan aktif hale geçerek olumsuz durumun olduğu bölgede rol oynamaktadır (Lenz ve Nelson 2018). Kemirgenlerde mikroglia oluşumu embriyonik dönemin gün 8-10. günü başlar ve hemen beyni kolonize eder (Reemst ve ark 2016). Sinaptogenez sırasında aşırı nöronların apoptozunu indükler ve hatta trombospondinlerin salınması yoluyla gelişimsel sinaps oluşumunu düzenlemektedir (Bessis ve ark 2007). Mikroglianın beyindeki patolojik değişikliklere cevap veren ve astrositleri toplamak ve iltihabı daha da kötüleştirmek için sitokinleri ve prostaglandinleri serbest bırakan ilk glial hücre tipi olduğu düşünülmektedir (Kreutzberg 1995).

MSS'deki nöroenflamasyon sırasında, mikroglia, periferik makrofajlarla karşılaştırılabilir bir fonksiyon olan fagositoz ile hücresel kalıntıları yok eder (Vilhardt 2005). Mikroglia fizyolojik koşullar altında hareketsiz değildir; ancak son derece hareketli ve çevredeki mikro çevrenin sürekli olarak gözetim altında tutulduğu süreçlerdir (Dheen ve ark 2007). Daha da önemlisi, mikroglia, çevreye hızla uyum sağlamak için morfolojilerini değiştirmektedir (Napoli ve Neumann 2009). Nöronal yaralanmadan sonra, mikroglia glutamat veya ATP salımı gibi uyarıcı sinyallere yanıtta morfolojik değişikliklere ve özellikle

nöronlar, astrositler ve oligodendrositler tarafından bir dizi hücreden salınan TGF-β veya CD200 gibi azaltılmış inhibitör sinyallerine maruz kalır (Biber ve ark 2007). Sonuç olarak, reaktif mikroglia bağışıklık yanıtı, hasarlı hücreleri çıkarmakta ve fagositoz yoluyla dokuları onarmaktadır (Kreutzberg 1996, Colonna ve Butovsky 2017, Lenz ve Nelson 2018).

2.3.3. Astrositler

Nöroektodermden köken alan ve merkezi sinir sistemi hücrelerinin %90'ını oluşturan hücrelerdir (Blackburn ve ark 2009). Kemirgenlerde astrosit oluşumu embriyonik dönemin 18. günü ile doğumdan sonra 7. güne kadar gerçekleşmektedir (Reemst ve ark 2016). Beyindeki elektrik iletimini düzenlemektedir. Nöronları beslemek için glikojeni glikoza dönüştürbilen astrositler KBB'yi oluşturan endotelyal hücreleri üzerinde de önemli rol oynamaktadır. Astrositler sinir sisteminde meydana gelen hasar doğrultusunda o bölgede konumlanmakta, iyon dengesini sağlamakta ve enerji için ATP salgılyabilmektedir. (Araque ve Navarrete 2010).

Astrositler, sinaptik glutamat salınımı öncesi ve sonrası nöronal aktiviteyi etkilemektedir. Astrositlerin sinaptik işleve uyum sağlaması fikri, 'üçlü' sinaps kavramına yol açmıştır (Perea ve ark 2009). Bağışıklık tepkisinin başlatılması sırasında salınan sitokinler, astrositleri, en önemlisi GFAP olan astrosit ara filament proteinlerinin yukarı regülasyonu ile karakterize edilen reaktif gliyozise uğrayacak şekilde uyarmaktadır (Pekny ve ark 2014). Mikrogliaya benzer şekilde, reaktif astrositler morfolojik değişikliklere uğramakta ve bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için çoğalmaktadır. (Sofroniew ve Vinters 2010).

Astrositler ve mikroglia farklı biyokimyasal belirteçleri ifade etmektedir. Özellikle, astrositler uyarıcı amino asit taşıyıcıları EAAT1-EAAT5'i ifade ederken, mikroglia EAAT4'ten yoksundur (Liang ve ark 2008). Ayrıca, astrositler mikrogliadan daha fazla EAAT ifade ederler ve sonuç olarak astrositler tarafından glutamat alımı hücre dışı glutamat seviyelerinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Anderson ve Swanson 2000). Glutamat alımında göze çarpan bir rol astrositlerin glutamaterjik nörotransmisyonun hassas uzamsal ve zamansal iletimini kolaylaştırır, böylece çevredeki sinapsların aktivitesini düzenlemektedir (Marcaggi ve Attwell 2004).

Astrositler ayrıca mikrogliadan daha az morfolojik olarak reaktiftir, bu da potansiyel olarak uyaranlara cevap vermede ikincil bir rolü göstermektedir (Liddelow ve ark 2017, Shinozaki ve ark 2017). Reaktif mikroglianın reaktif astrositlerin bir alt grubunda nöroprotektif etkilerin ve nörotoksik aktivitenin indüksiyonunu tetiklediğini göstermektedir.

Bununla birlikte, hem mikroglial hem de astrositik popülasyonların da çift yönlü iletişim yoluyla modüle edildiği açık bir şekilde belirtilmektedir (Gao ve ark 2013).

2.3.4. Sitokinler

İnflamatuvar yanıta katılan hücrelerin etkinliklerinin artırılmasında önemli role sahip peptid veya glikoprotein yapısında maddelerdir (Noronha ve ark 1995). Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak hedeflenen hücrelerin davranışını etkiler ve özel hücreler tarafından salgılanmaktadır. Sitokinler hücresel reseptörlere bağlanarak farklı dokulardan salgılanırlar. Ancak aynı biyolojik lokal etkiyi göstermektedirler (O'Reilly ve ark 1995).

Bağışıklık sisteminde doğuştan (özgül olmayan) ve adaptif (özgül) bağışıklık sistemi altında farklı sitokinler bulunmaktadır. doğuştan bağışıklık sistemi ile üretilen sitokinlere IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-α iken adaptif immün sistem ile üretilen sitokinlere IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10'dur. Ayrıca, sitokinler inflamatuvar aktiviteyi arttıranlar (pro-inflamatuvar sitokinler) ve inflamatuvar aktiviteyi azaltan veya artan inflamatuvar aktiviteyi dengeleyenler (anti-inflamatuvar sitokinler olarak) sınıflandırılmaktadır. Bu kapsamda pro-inflamatuvar sitokinler IL-1, IL-6, TNF-α, INF-γ ve anti-inflamatuvar sitokinler (sitokin sentez inhibitörleri) IL-4, IL-10, IL-12, IL-13'tür. IL-8 gibi bazı sitokinler ise hem pro-inflamatuvar hem anti-inflamatuvar özellik göstermektedir (Dinan 2009, Raison ve ark 2009).

2.3.4.1. Pro-inflamatuvar Sitokinler

Pro-inflamatuvar sitokinler patojenle karşılaştıklarında oluşan doku hasarı ya da strese karşı cevap olarak salgılanarak immün sistem ve beyin arasındaki iletişimi sağlamaktadır (Baune ve ark 2010). Pro-inflamatuvar sitokinlerin artışı anti-inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Oluşan inflamatuvar cevap ortadan kaldırılmazsa bunun sonucunda nöroenflamasyon ve nöropsikiyatrik bozukluklar meydana gelebilmektedir. Nöroinflamatuvar hipotezde, depresyon etiyo-patogenezinde pro-inflamatuvar sitokinlerin veya immun sistemin rolü olabileceği öne sürülmektedir (Koj 1985, Virelizier 1985). Pro-inflamatuvar sitokinler inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol almakta ve IL-1, IL-6 ve TNF-α olarak bilinmektedir.

IL-1, monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve mikroglialar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınmaktadır. İnflamasyon, sepsis, diyabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir. IL-1β ve TNF-α nörit büyümesi,

oligodentrosit toksisitesi ve hipokampüsteki homeostatik sinaptik plastisitenin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmektedir (Kurt-Jones ve ark 1985). TNF-α, lokal nötrofilik infiltrasyon, Schwartman reaksiyonu sonucu tümör nekrozu, endojen pirojen etki, akut faz reaktanlarında artış, kafleksi, nötrofili ve anjiogenezis, endotelyal hücreler ve astrositler üzerinde ICAM-1 ekspresyonu artışında rol oynamaktadır (Kurt-Jones ve ark 1985).

IL-6, hedef hücreye bağlı olarak büyüme üzerinde etkili olarak farklılaşmayı sağlamaktadır. B hücrelerinin farklılaşması (immünglobulin salınımı), B hücrelerinde büyümenin uyarılması, hepatik akut faz yanıtın oluşması, makrofajlar ve T hücrelerinin aktifleşmesi ve değişikliği ile nöronal farklılaşma IL-6 aracalığı ile gerçekleşmektedir. Ayrıca nöron çoğalması, gelişimi ve ölümü gibi süreçlere etki edebilecek olayları doğrudan etkilemektedirler (van de Veerdonk ve Netea 2013).

2.3.4.2. Anti-inflamatuvar Sitokinler

Anti-inflamatuvar sitokinler IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF-β olarak bilinmektedir. IL-4, IL-10, IL-13 bağışıklık yanıtını ve bazı sitokinlerin sentezini baskılamaktadır. IL-2, T hücreleri için ana büyüme faktörüdür. Düşük düzeyde Tc hücreleri tarafından üretilse de Th hücreleri tarafından üretilmektedir. B hücrelerinin büyümesini, NK hücreleri ve monositleri aktivasyonunda önemli rol üstlenmektedir. T hücreleri üzerinde otokrin etkilidir. IL-4, Th2 hücre büyümesini sağlarken makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilmektedir. Ayrıca, Ig sınıfının IgE izotipine anahtar çevirimini stimule etmektedir. Anti- inflamatuvar sitokinlerden önemli bir yere sahip olan IL-10, depresyon, sitokinler ve bağışıklık sistemi hücrelerinden sitokin yapımını baskılamak olduğu için orjinal “sitokin sentez inhibitörü” olarak bilinmektedir. Bazı sitokinler alışılmadık bir şekilde hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etkinlik göstermektedir. Örneğin IL-8, lokal inflamasyon sırasında nötrofil etkinliğini sağlamaktadır. IL-8’in inflamasyon sahasında hızla çoğalması da inflamasyona nötrofil infiltrasyon yanıtını azaltıcı etki göstermektedir (Meyer 2011).

2.3.5. Endotelyal Hücreler

Endotelyal hücreler kan ve doku arasında bariyer görevi dışında oluşan değişik uyarılara cevap verebilen aktif bir organdır. Hücre koruyucu genlerin oluşumu, hücrelerin aktivasyonu, konakçı koruması ve dokuların tamirinde önemli rol oynamaktadır (Matthay 2001).

Endotelyal hücreleri pasif bir işlevi olsa da angiogenesis göç etme ve bölünme sırasında yeni damar oluşumunu başlatabilme kapasitesine sahiptir. Ayrıca damarların tipi ve yerine bağlı olarak endotelyal hücreler damar geçirgenliğinde de rol oynar. Damarlar lipofilik ve düşük molekül ağırlıklı hidrofilik maddelerin kan ve dokular arasında geçişine izin verirken makromoleküller için seçici geçirgen davranır. Çünkü ekstravasküler ve inravasküler sıvı dengesinin devamlılığı için bu yarı seçirgen bariyer gerekmektedir. İntertisiel alana antikorlar sitokinler hormonlar vb. maddelerin geçişi inflamasyon, yara iyileşmesi ve immün cevap gibi olayların başlaması ve sürdürülebilmesi için gereklidir (Siflinger-Birnboim ve Malik 1996).

2.3.6. Nöroenflamasyon ve Otizm Spektrum Bozukluğu

Nöroenflamasyon; merkezi sinir sistemi elemanlarının bir parçası olan mikroglia, astrositler, KBB'ye katılan endotelyal hücrelerinin, plazma proteinlerinin ve immün sistem hücrelerinin bir hasar veya şiddetli uyaran karşısında verdikleri yanıttır (Matta ve ark 2019).

Aktive-T hücreleri sağlıklı beyinde işlev gören çeşitli durumlarda KBB'yi geçebilen immün sistem elemanıdır (Poletti ve ark 2019). Aktive-T hücreler ilgili yabancı madde ile karşılaşınca sitokin ve kemokinleri üretmekte ve diğer T hücreler, B hücreler ve monositler gibi diğer lökositlerin kandan geçişini sağlamaktadır. Üretilen pro-inflamatuvar sitokinler ile mikroglia ve astrositlerde aktif hale gelmektedir. Aktive mikroglia ve astrositlerin ürettiği ek pro-inflamatuvar sitokinler, kemokinlerve proteazlar inflamatuvar cevabı arttırmaktadır (Ojo ve ark 2019). Artan perivasküler inflamasyon KBB'yi bozarak inflamatuvar hücrelerin geçişini artarak hasar meydana gelmektedir. İnflamasyonun oluşumuna aracılık eden Aktive T hücreleri merkezi sinir sisteminde ilgili antijene rastlamaz ise kana, lenfatik sisteme dönebilir veya apoptoza uğramaktadır (Matta ve ark 2019, Ojo ve ark 2019, Poletti ve ark 2019).

Normal koşullar altında, astrositler ve mikroglia sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı ile sinapsların oluşumu ve budama yanı sıra plastisiteyi düzenlemektedir. OSB'li bireylerde KBB'deki bozulmalar, bağışıklık hücrelerinin alımı ve reaktif astrosit ie beyindeki glial fenotipik değişiklikleri ve sitokinlerin ve kemokinlerin artmış salgılanmasını tetiklemektedir. Meydana gelen değişiklikler sinaps oluşumu, budama ve plastisite gibi süreçleri bozmakta ve nöronal dendritik dallanma ve omurga yoğunluğunu, belirli beyin bölgelerinin yetersiz ve spin yoğunluğunu ve nöronal bağlantıyı değiştirmektedir (Matta ve ark 2019).

Mikroglia ve astrositler arasındaki çift yönlü iletişimin çoğu, sinyal molekülleri ve sitokin seviyesindeki artıştan kaynaklanmaktadır (Zhang ve ark 2010). Reaktif mikroglia, astrosit reaktivitesini tetikleyebilen bir dizi sitokin ve kemokin salgılamaktadır. IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α ve IFN-γ dâhil olmak üzere çoğu sitokin ve kemokinin GFAP yoluyla ölçüldüğü gibi reaktif astrogliyozu indüklediği tespit edilmiştir (Balasingam ve ark 1994).

Artan mikroglial aktivasyon ve mikroglial uzantılarda uzama gibi morfolojik değişikliklerle karakterize edilen değişmiş mikroglial aktivitesi OSB postmortem doku örneklerinin korteksi, serebral korteks boyunca devam etmektedir (Edmonson ve ark 2014). Bu aktivite miyeloid hücreler üzerinde eksprese edilen tetikleyici reseptör TREM2, reseptör ile ilişkili proteini aktive eden öldürücü hücre DAP12 / KARAP ve CX3C kemokin reseptörü olan CX3CR'in gen ekspresyonunun artmasıyla desteklenmektedir (Tetreault ve ark 2012). Bununla birlikte, serebellumda aynı mikroglial belirteçlerin seviyeleri iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü (IBA1/AIF1) ilavesiyle bölgesel spesifik mikroglia modülasyonu azalmaktadır (Tetreault ve ark 2012, Edmonson ve ark 2014).

Postmortem bir çalışmada, kortikal bölgede ve beyaz maddede geniş mikroglial aktivite, serebellumun granüler hücre tabakasında ve beyaz maddesinde astrosit ve beyinciğin, orta frontal girus ve ön singulat girusunda önemli ölçüde GFAP protein ekspresyonu artışı belirlenmiştir. Ayrıca azalmış purkinje ve granüler hücreleri içeren belirgin histolojik değişiklikler ve serebellumun purkinje hücre katmanındaki azalmış aksonlar tespit edilmiştir. OSB'li bireylerin dorsolateral prefrontal korteksinde artan reaktif mikroglia yoğunluğu gözlenmiştir (Vargas ve ark 2005, Morgan ve ark 2010).

OSB hastalarından alınan BOS örneklerinde GFAP seviyeleri kontrollere göre ortalama üç kat daha yüksektir. OSB postmortem superior frontal, paryetal ve serebellar korteks örneklerinde sağlıklı kontrollere kıyasla artmış GFAP düzeyleri gözlenmiştir (Laurence ve Fatemi 2005).

IBA-1 ile işaretli beyin kesitlerinin yoğunluk analizlerinde OSB'li bireylerin dorsolateral prefrontal korteksindeki mikroglia ve nöronların, kontrollere göre daha yakın bir konumda bulunduğu tespit edilmiştir. Nöronların mikroglia ile çevrelenmesiyle karakterize edilen bir etkileşim olduğunu gösterdiği ve artan etkileşimi gösterilmiştir. Mikroglia ve nöronların yakınlığındaki bu azalma, OSB'de işlevselliğin değiştiğini göstermektedir. Nöronlara yakın bir şekilde bulunan mikroglia, nöroprotektif bir fonksiyon olarak işlevsiz sinapsların bozulmasını aktif olarak arttırmaktadır ve beyin dokusunda mevcut sinaptik bozukluğu şiddetlendirmektedir (Morgan ve ark 2012, Edmonson ve ark 2014).

Deneysel OSB fare modellerinde bağışıklık fonksiyon bozukluğu ve sinaptik bozukluklar da rapor edilmiştir. Çalışmalarda OSB için bir risk faktörü olarak tanımlanan MİA modelleri tanımlanmıştır. Kemirgenlerdeki bağışıklık sisteminin uyarılması ile gebelik sırasında lipopolisakkarit artışı ve polinosinik ile kemokin ve sitokin salınımı artmaktadır. Bununla birlikte değişmiş mikroglial reseptör fonksiyonu, hipokampüste sinaptik budama ile bağışıklık düzensizliği ve OSB ile karakterize davranışlar tespit edilmiştir (Atladottir ve ark 2010, Malkova ve ark 2012).

Mikroglial bir belirteç olan CD11b antikoru ile yapılan bir çalışmada aktif ve toplam mikroglia sayısı, MİA yavrularında değişmeden kalır (Fernandez de Cossio ve ark 2017). Özellikle anti-inflamatuvar reaktifler, luteolin ve diosmin uygulanması yoluyla IL-6 aktivitesini hibridize ederek bağışıklık tepkisini azaltmasına, MİA yavrularında otizm benzeri davranışların hafifletilmesine neden olur (Hsiao ve ark 2012). MİA yavruları, kontrol farelerine göre sıkı bağlantı proteinlerini kodlayan gen ifadesi ile ölçülen ince bağırsak geçirgenliği göstermektedir. Bununla birlikte azalmış IL-12p40/p70 ve MIP-1a dâhil olmak üzere değiştirilmiş sitokin ve kemokin ekspresyonunu göstermektedir (Parker-Athill ve ark 2009, Hsiao ve ark 2012, Hsiao ve ark 2013, Fernandez de Cossio ve ark 2017).

Nöroimmünolojik bozukluklar otizm ve nörogelişimsel bozuklukları çoklu hayvan modellerinde gözlenir (Budimirovic ve Kaufmann 2011). Frajil X Sendromu, X kromozomuyla ilişkili bir zekâ geriliği sendromudur. Otistik belirtileren bu hastalık X kromozomu üzerinde bulunan FMR1 geninde oluşan mutasyon sonucunda meydana gelir (Pacey ve ark 2015). Yapılan bir çalışmada MİA'ya benzer şekilde, FMR1 proteinin bloke edildiği farelerde mikroglial ekspresyon değişmeden kalır. Bununla birlikte, aynı çalışmada astrositler, artan GFAP ekspresyonu ve TNFR-2 ekspresyonunun artmasıyla ölçüldüğü üzere, doğum sonrası gelişim sırasında ve yetişkinlik döneminde reaktif bir durumda kalmıştır (Lucchina ve Depino 2014).

Gebe farelere valproat verilmesi ile doğan bebek farelerde deneysel OSB modeli oluşturulan bir çalışmada günde 600 mg / kg valproik asit enjekte edilmiştir. Farelerde, kontrollere göre artmış hipokampal mikroglial yoğunluk ve serebellumda pro-inflamatuvar sitokinlerin TNF-α ve IL-6'nın ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Christensen ve ark 2013). Ayrıca siyah ve Tan Brachyury fareleri otizm benzeri davranışlar sergilediği görülmüştür. Öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında yer alan Şizofreni 1'de yapısı bozulmuş bir gen olan DISC1 geni gibi otizm ve şizofreni gibi nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili ekspresyon mutasyonları ele alınmıştır (Kilpinen ve ark 2008). IL-33, IL-18 ve IL-1β beyin

sitokin düzeylerinde artış, dalakta, mezenterik lenf düğümlerinde ve periferik kanda CD4 + T hücrelerinin sayısında artış ve kontrollere göre mikroglial hücrelerin oranında artış tespit edilmiştir. Ters kortikal tabakalanma gösteren Reeler fareleri de dâhil olmak üzere diğer nörogelişimsel bozukluk modelleri, yabani tip farelerine göre beyin ve serumda IL-18 seviyelerini değiştiği görülmüştür. Toplu olarak, bu bulgular otizmle ilgili kemirgen modellerinde anormal nörogelişim ve anormal inflamatuvar yanıtlar arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Kilpinen ve ark 2008, Heo ve ark 2011, Christensen ve ark 2013, Businaro ve ark 2016)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Veterinerlik Patolojisi Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (25.10.2019 tarihli ve 2019-47 protokol no'lu karar) bu çalışmada tüm uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada Rompun (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti), Ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya), Propiyonik asit (Chem Cruz, (Dallas, TX, Amerika Birleşik Devletleri), Dewax solüsyonu (Bond™, Leica AR9222), Alkol (%100-70) (Sigma), Özel yıkama solüsyonu (Bond™, Leica, AR9590), Isı kaynaklı antijen retrieval (HIER1, Citrate Buffer Ph:6.0, Leica, AR9961) kullanıldı.

3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler

Çalışmada Hamilton 801 Serisi Enjektör (32165 10 µl, Reno, Nevada 89502, Amerika Birleşik Devletleri), Hamilton 801 Serisi Enjektör İğnesi (84853, 10 µl,Reno, Nevada 89502, Amerika Birleşik Devletleri), Doku takip cihazı (Leica TP 1020), Mikrotom (Leica RM 2125RT), Işık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan), Kamera (Olympus, EP50), Boyama cihazı (Leica Bondmax), Kit (Bond™ Polymer Refine Detection (Leica DS9800)), Anti- CD68 antikor (Abcam, ab32503, Amerika Birleşik Devletleri), Anti-GFAP antikor (Abcam, ab59348, Amerika Birleşik Devletleri), Morris Su Tankı, Stereotaksi aleti ((World Precision Instruments, Inc., Model 502600, İngiltere) kullanıldı.

3.3. Ratların Temini ve Bakımı

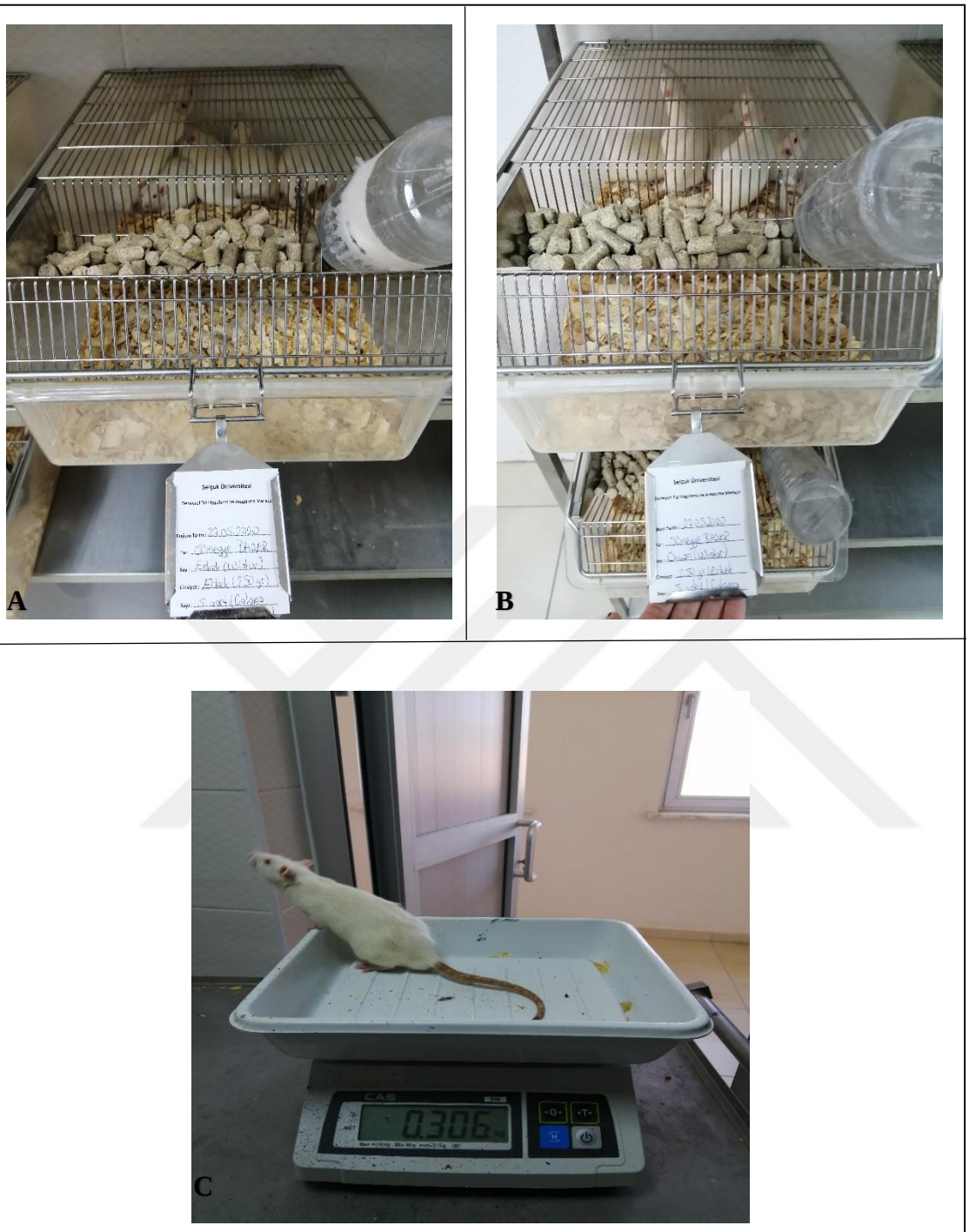
Araştırmada Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlıkları 250-300 gram olan 8-12 haftalık *Wistar albino* toplam 25 adet erkek rat kullanıldı. Deney süresince ratlar sıcaklığın 21° C ve ortam neminin % 55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular, ad libitum olarak standart sıçan yemiyle beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.

3.4. Grupların Oluşturulması

Deneye başlamadan önce hayvanlar ağırlıklarına göre eşit olacak şekilde aşağıdaki gibi 2 gruba ayrıldı (Şekil 1).

1- Kontrol Grubu (KG n=5): Bu grup 30 gün boyunca ad libitum yemi ile beslendi. Bu gruptaki hayvanlar, ilk 9 gün ve 11.-20. günlerde Morris su tankı testi (MSTT) ne katıldı. 10.gün i.s.v. olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.
2- Çalışma Grubu (ÇG n=20): Bu grup kontrol grubu gibi ilk 9 gün ve 11.-20. günlerde MSTT ye katıldı. 10. gün i.s.v. olarak PPA enjeksiyonu yapıldı.

Çalışma grubunda yer alan 20 rattan 1'i anestezik stres ya da çevresel koşulların meydana getirdiği stres etkisiyle çalışmadan çıkarıldı.

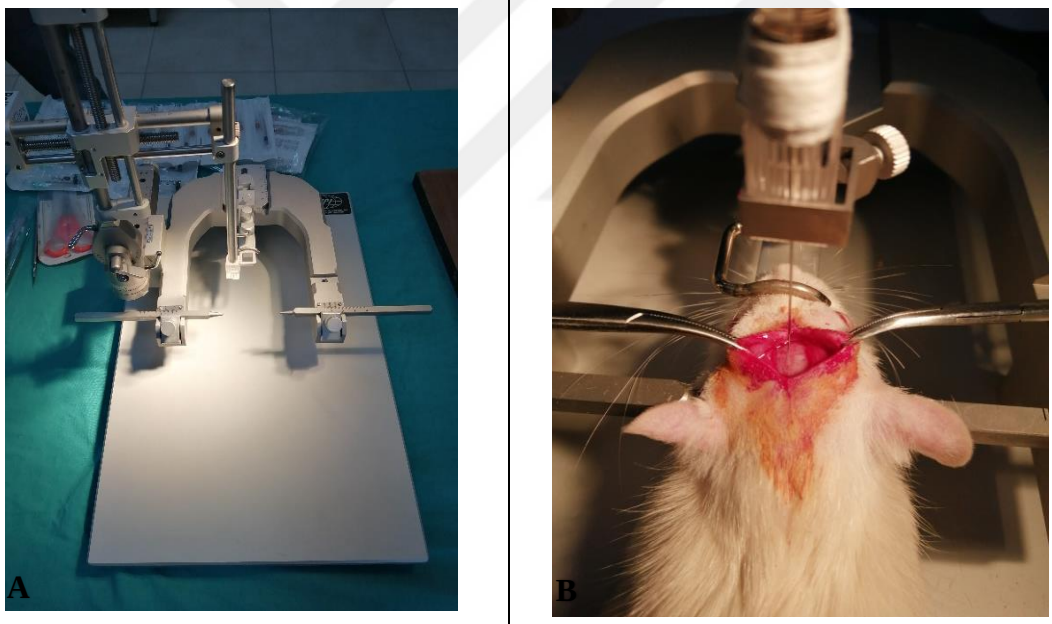


Şekil 1. **A**: Çalışma gruplarının oluşturulması **B**: Kontrol gruplarının oluşturulması **C**: Gruplarda yer alan ratların tartılması.

3.5. İntraserebroventriküler (i.s.v.) Enjeksiyon

Ratların sağ ventrikül bölgesi topografik anatomik lokasyon yöntemi ile stereotaksi cihazı (World Precision Instruments, Inc., Model 502600, İngiltere) ile tespit edildi. Sağ

ventrikül bölgesi tespit edilen ratlara uygulamadan hemen önce ağrı ve acı çekmemeleri için intraperitoneal olarak 10 mg/kg Rompun (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve 70 mg/kg Ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya) ile anestezi uygulandı. Hayvanlar fizyolojik yanıtları (parmak kıstırma gibi) takip edilerek anestezi etkisine girdikten sonra kafaları tıraş edilip operasyon için hazır hale getirildi. Sonrasında hayvanlar stereotaksik cihaza kulakları ve ağzı cihaza sabitlenerek yere paralel şekilde yerleştirildi. Kafa derisi sagital olarak bistüri yardımıyla açıldıktan sonra bregma noktası belirlenip stereotaksi koordinatlarına göre ventrikülde matkapla delik açıldı (Tablo 1). Sağ ventrikülün stereotaksik koordinat noktaları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi. Ventrikül giriş noktası referans noktası olan bregmadan anterior/posterior -1,4 mm; medial/lateral 1,8 mm; dorsal/ventral -3,0 mm gidilerek tespit edildi (Tablo 2-3). Belirlenen noktadan matkapla kafatası kemiği delindikten sonra kontrol grubuna tek doz (4 µl) serum fizyolojik ve çalışma grubuna tek doz (4 µl, 0,26 M) PPA verildi (Şekil 2) (Tablo 4).



Şekil 2. A: Sağ ventrikül tespiti için kullanılan stereotaksi cihazı **B:** Stereotaksik koordinat noktaları belirlenen rata PPA enjeksiyonu aşaması.

Enjeksiyon tamamlandıktan sonra hayvan cihazdan çıkarılıp kesi bölgesi dikiş ile kapatıldı. Hayvanlar kafeslere alındıktan sonra yiyeceğe ve suya ulaşabilecekleri şekilde iyileşme sürecine bırakıldı.

Tablo 1. Gruplarda yer alan hayvanların bregma ve lambda koordinatları.

Gruplar/ Koordinatlar	Bregma	Lambda
KG1	3,40 cm	3,36 cm
KG2	3,39 cm	3,36 cm
KG3	3,43 cm	3,43 cm
KG4	3,13 cm	3,15 cm
KG5	3,13 cm	3,15 cm
ÇG1	3,23 cm	3,23 cm
ÇG2	3,35 cm	3,34 cm
ÇG3	3,31 cm	3,35 cm
ÇG4	3,13 cm	3,15 cm
ÇG5	3,24 cm	3,24 cm
ÇG6	3,77 cm	3,82 cm
ÇG7	3,89 cm	3,87 cm
ÇG8	3,63 cm	3,68 cm
ÇG9	3,26 cm	3,23 cm
ÇG10	3,43 cm	3,43 cm
ÇG11	3,28 cm	3,30 cm
ÇG12	3,35 cm	3,36 cm
ÇG13	3,23 cm	3,26 cm
ÇG14	3,27 cm	3,26 cm
ÇG15	3,35 cm	3,40 cm
ÇG16	3,48 cm	3,48 cm
ÇG17	3,39 cm	3,36 cm
ÇG18	3,35 cm	3,31 cm
ÇG19	3,20 cm	3,23 cm

Tablo 2. Sağ ventrikül beyin bölgeleri ve stereotaksik koordinatlar.

Beyin Bölgeleri	Koordinatlar
Dorsal-Ventral	0,3 cm
Medial-Lateral	0,14 cm
Anterior-Posterior	0,18 cm

Tablo 3. Sağ ventrikül stereotaksik koordinat noktaları.

Gruplar / Beyin Bölgeleri	Dorsal-Ventral	Medial-Lateral	Anterior-Posterior
KG1	3,40 cm	2,18 cm	5,60 cm
KG2	3,39 cm	2,03 cm	5,20 cm
KG3	3,43 cm	1,65 cm	5,34 cm
KG4	3,13 cm	2,25 cm	5,86 cm
KG5	3,13 cm	2,25 cm	5,86 cm
ÇG1	3,23 cm	1,70 cm	5,16 cm
ÇG2	3,35 cm	2,14 cm	5,42 cm
ÇG3	3,31 cm	1,97 cm	5,43 cm
ÇG4	3,13 cm	2,25 cm	5,86 cm
ÇG5	3,24 cm	2,26 cm	5,85 cm
ÇG6	3,77 cm	1,36 cm	5,71 cm
ÇG7	3,89 cm	2,03 cm	5,54 cm
ÇG8	3,63 cm	1,93 cm	5,59 cm
ÇG9	3,26 cm	2,40 cm	5,3 cm
ÇG10	3,43 cm	1,65 cm	5,34 cm
ÇG11	3,28 cm	1,64 cm	6,06 cm
ÇG12	3,35 cm	2,19 cm	5,34 cm
ÇG13	3,23 cm	1,44 cm	5,1 cm
ÇG14	3,27 cm	2,02 cm	5,82 cm
ÇG15	3,35 cm	1,76 cm	5,35 cm
ÇG16	3,48 cm	1,78 cm	5,88 cm
ÇG17	3,39 cm	2,03 cm	5,20 cm
ÇG18	3,35 cm	2,10 cm	5,18 cm
ÇG19	3,20 cm	1,98 cm	5,70 cm

Tablo 4. Sağ ventrikül i.s.v. enjeksiyon yapılan stereotaksik koordinatlar.

Gruplar / Beyin Bölgeleri	Dorsal-Ventral	Medial-Lateral	Anterior-Posterior
KG1	3,10 cm	2,0 cm	5,46 cm
KG2	3,09 cm	1,85 cm	5,06 cm
KG3	3,13 cm	1,51 cm	5,20 cm
KG4	2,83 cm	2,07 cm	2,83 cm
KG5	2,83 cm	2,07 cm	2,83 cm
ÇG1	2,97 cm	1,52 cm	5,02 cm
ÇG2	3,05 cm	1,96 cm	5,28 cm
ÇG3	3,01 cm	1,79 cm	3,01 cm
ÇG4	2,83 cm	2,07 cm	2,83 cm
ÇG5	2,94 cm	2,08 cm	5,71 cm
ÇG6	3,47 cm	1,18 cm	5,57 cm
ÇG7	3,59 cm	1,85 cm	5,40 cm
ÇG8	3,33 cm	1,75 cm	5,45 cm
ÇG9	2,96 cm	2,22 cm	5,16 cm
ÇG10	3,13 cm	1,51 cm	5,20 cm
ÇG11	2,98 cm	1,46 cm	5,92 cm
ÇG12	3,05 cm	2,01 cm	5,20 cm
ÇG13	2,93 cm	1,26 cm	5,57 cm
ÇG14	2,97 cm	1,84 cm	5,68 cm
ÇG15	3,05 cm	1,58 cm	5,21 cm
ÇG16	3,18 cm	1,6 cm	5,74 cm
ÇG17	3,09 cm	1,85 cm	5,06 cm
ÇG18	3,05 cm	1,82 cm	5,04 cm
ÇG19	2,90 cm	1,80 cm	5,56 cm

3.6. Morris Su Tankı Testi (MSTT)

Deney hayvanları ile yapılan davranış çalışmalarında kullanılan bir testtir. Gruplarda deneysel olarak otizm modelinin gelişip gelişmediğini belirlemek için içi su dolu bir tankta, tank üzerinde yer alan platforma yüzme süresi, platforma ulaşmak için kat edilen mesafe, nesne yönelimli davranış testler gerçekleştirilmektedir. Tank; kuzey, güney, batı, doğu olmak üzere hayal olarak dört kadrana bölünecek ve 25 cm yüksekliğinde, 10 cm çapındaki platformu kuzeydoğu yönünde yerleştirilmektedir. Tankın üzerinde yer alan kamerayla modelin istenilen sürede yüzüşü videoya alınacak ve hafıza durumunun kontrolü için en az 5 gün boyunca bu yüzdürme deneyi yapılmaktadır (MacFabe ve ark 2007, Fazlioglu ve Baran 2008, Shultz ve ark 2008, MacFabe ve ark 2011, Macfabe 2012).

İçi su dolu bir tank (90 cm çap, 40 cm yükseklik) ve kuzey doğu yönünde yer alan 25 cm yüksekliğinde, 10 cm çapında ve tank kenarına 5 cm uzaklıktaki platform hazırlandı. Tank; kuzey, güney, batı, doğu olmak üzere hayal olarak dört kadrana bölündü. Her kadranın ortası çeşitli renk ve şekildeki göstergelerle işaretlendi ve hayvanların görebileceği şekilde tankın etrafına sabitlendi (Şekil 3). Kontrol grubu ve çalışma grubunda yer alan ratlar her dört kadrandan da suya bırakılarak platforma ulaşma süreleri ve kat ettikleri mesafe kamera ile kayıt altına alındı.



Şekil 3. Morris Su Tankı ve kadranlara ait göstergeler.

3.7. Ötenazi, Beyin Dokusu Diseksiyonu ve Makroskobik Muayene

Deneme süresi sonunda, ratların canlı ağırlıkları belirlendikten sonra ağrı ve acı çekmemeleri için intraperitoneal olarak 10 mg/kg rompun (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve 70 mg/kg ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya) ile anestezi uygulanarak ötenazi edildi. Servikal dislokasyon gerçekleştirildikten sonra usulüne uygun olarak kalvaryum uzaklaştırılarak beyin çıkarıldı. Beyin, beyincik ve beyin kökü makroskobik olarak muayene edilmesinin ardından bu dokuların ortasından geçen sagital bir kesit ile ikiye ayrıldı. Daha sonra sol hipokampüs bölgesi diseksiyon edilerek karyotüplerde -80°C derecede dondurulduu. Sağ hemisfer, beyincik ve beyin kökü ise histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapılmak üzere %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alındı (Şekil 4).



Şekil 4. **A:** Beyin dokusu diseksiyonu, **B:** Rat beyin dokusu, **C:** Sağ ve sol hemisfer, **D:** Sol hipokampüs.

3.8. Histopatolojik Analizler

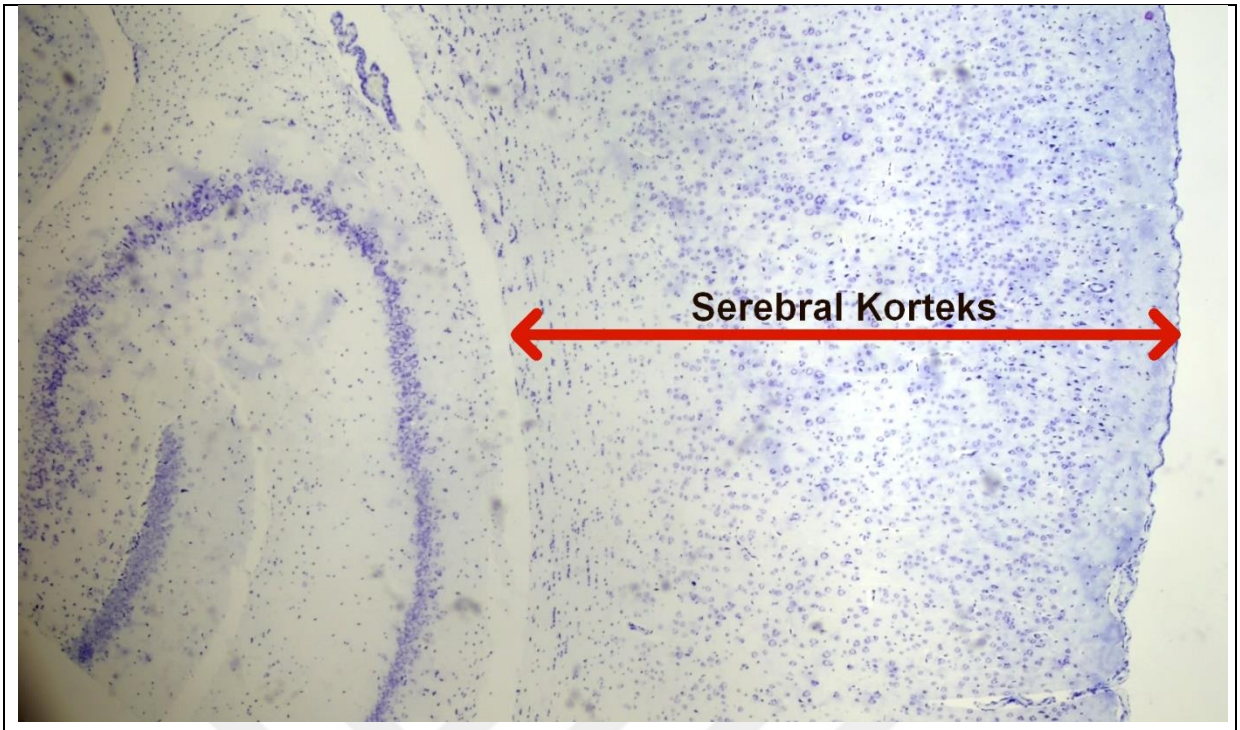
3.8.1. Hematoksilen Eozin Boyama

Alınan beyin dokuları %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 24 saat boyunca tespiti yapıldı. Tespitin ardından, alınan dokular 24 saat süreyle akan suda yıkandıktan sonra doku takip cihazına (Leica TP 1020) alınarak rutin histopatolojik takibi yapıldı. Daha sonra parafine bloklanan dokuların soğutulmasının ardından mikrotomla (Leica RM 2125RT) 5µ kalınlığında kesilerek 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildi. Bütün kesitler, 3 tekrarlı (3 x 5 dk) ksilol serisinde deparafinize edilerek dereceli alkollerden (%100-70) geçirildi. Ardından, Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanan kesitler (Luna 1968), 5 ataçmanlı binoküler başlıklı ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Histopatolojik bulgular ayrı ayrı kaydedilerek karakteristik bulguların fotoğrafları (Olympus, EP50) çekildi.

3.8.2. Nissl Boyama Metodu

Nissl boyama (NS) için yukarıda açıklandığı gibi tespiti yapılarak 5µ kalınlığında pozitif şarjlı lamlara aktarılan hipokampüs ve serebral korteks bölgelerini kapsayan koronal kesitler öncelikle ksilol (3 x 5 dk) ve alkol serilerinden (%100-70) geçirildi. Daha sonra, % 0.1 Cresyl violet solüsyonu ile 5 dakika boyunca 37 C°'de boyandı. Distile su ile hızlıca durulandıktan sonra % 95'lik etil alkol içinde 5 dakika dekolorize edildi. Dehidrasyon ve ksilol (2x5 dk) ile parlatıldıktan sonra Mount ile kapatılarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi.

Serebral (prefrontal) korteks kalınlığı, 4x büyütmede alınan görüntülerden yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak bulundu (EPview 1.2, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Almanya) (Şekil 5). Hipokampüs'ün CA1 ve CA3 bölümlerinin piramidal katman kalınlığı EPview 1.2, hücre sayımları ve hücrelerin boyanma yoğunluğu ise Imaje J (1.54d versiyon, National Institutes of Health, ABD) yazılımı aracılığı ile belirlendi. Bu program boyanma yoğunluğunu 0-255 arasında sayısal bir değere dönüştürmektedir. Sıfır (0) değeri en koyu tonlamayı ifade ederken, 255 değeri en açık boyanmayı göstermektedir. Hücre sayımı yapılan hipokampüsün CA1 ve CA3 bölümlerine ait fotoğraflarda ilgili bölge sınırlandırılarak yoğunluk ölçümleri yapıldı. Bunun için öncelikle tüm vakalar içerisinde minumum (sıfıra yakın, en koyu) ve maksimum (255, en açık) değerler belirlendi. Bu değerlerin arasındaki fark 4'e bölünerek boyanma yoğunluğu aralıkları tespit edildi ve tüm vakalar boyanma yoğunluklarına göre skorlandı.



Şekil 5. Serebral korteks kalınlığının belirlenmesi, 4X, NS.

3.9. İmmunohistokimyasal analizler

İmmunohistokimyasal boyama (İHK) için, beyin, beyincik ve beyin kökünü kapsayan sagital 5 mikron kalınlığındaki kesitler, Leica Bondmax boyama cihazında, Bond™ Polymer Refine Detection (Leica DS9800) kit protokolüne göre (Peroksidaz Blok, Protein Blok, Post Primer, Polymer, DAB, Hematoksilen) boyandı. Öncelikle tüm dokular ısı ve dewax solüsyonu (Bond™, Leica AR9222) ile parafinden arındırıldı ve seri olarak dereceleri artan alkollerde (%100-70) (Sigma) rehidre edildi. Protokole göre kullanılan her bir kimyasal madde veya markerden sonra 3'er kez özel yıkama solüsyonu (Bond™, Leica, AR9590) ve/veya distile suyla yıkama yapıldı. Primer antikor üreticisinin önerisine göre tüm slaytlara; ısı kaynaklı antijen retrieval (HIER 1, Citrate Buffer Ph:6.0, Leica, AR9961) uygulandı. Non-spesifik boyanmanın önlenebilmesi için peroksidaz ve protein blok uygulaması gerçekleştirildi. Takibinde ise Primer antikorlar (2 adet; anti- CD68 antikor, (Abcam, ab32503, Amerika Birleşik Devletleri) ve anti-GFAP antikor (Abcam, ab59348 Amerika Birleşik Devletleri)) ile oda sıcaklığında değişen sürelerde inkübasyonun ardından post primer ve polymer uygulaması yapıldı (Tablo 5). Tüm kesitler, kromojen (DAB) ile 3 dakika reaksiyona bırakıldı ve distile suyla yıkandı. Ardından Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapılarak, dehidre edildi ve entellan (Merck) ile kapatıldı. Boyanan dokular ışık

mikroskobunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi ve gerekli görülenlerden fotoğraf çekildi (Olympus EP50, Tokyo, Japan).

İHK boyamaların değerlendirilmesinde incelenen alanlarda boyanmış hücre sayısı temel alınarak oluşturulan değerlendirme sistemi esas alındı. Buna göre her bir kesitte hipokampüs bölgesinde 40'lık büyütmede belirlenen 5 farklı alanda pozitif boyanan hücre sayılarının ortalamalarına göre skorlar belirlendi.

Tablo 5. Primer Antikorlara göre İmmunohistokimyasal Boyama Protokolleri.

Primer Antikor	Dilüsyon	Antijen Retriveal	Peroksidaz Blok	Protein Blok	Antikor İnkübasyon	Post Primer	Polymer	DAB	Hem.
CD68	1:100	HIER1-100°C-30 dk	30 dk.	30 dk.	90 dk.	10 dk.	10 dk.	3 dk.	2 dk.
GFAP	1:2000	HIER1-100°C-20 dk	30 dk.	30 dk.	60 dk.	8 dk.	8 dk.	3 dk.	2 dk.

Hem. : Hematoksilen

3.10. İstatistiksel analizler

3.10.1. Davranış Testi İstatiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPPS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Parametre sonuçları ortalama ±standart sapma ve minimum-maksimum olacak şekilde ifade edildi. Önce-Sonra ve gün parametrelerini gruplar arası karşılaştırılmada tekrarlı varyans analizi (repeated measures ANOVA), (post hoc Bonferroni) testi ile analiz edilmiştir. 0,05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.10.2. Histopatoloji İstatiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS for Windows® version 25.0) programı ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için *Kolmogrov – Smirnov*, varyansların homojenliği ise *Levene* testi ile yapıldı. Daha sonra tüm veriler bağımsız örneklem t testi ile analiz edilerek sonuçlar ortalama ± standart hata ($\overline{X}$±S$\overline{x}$) olarak elde edildi. P değeri 0,05'den küçük olan veriler (P<0,05) istatistiki açıdan önemli olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Morris Su Tankı Testi (MSTT) Bulguları

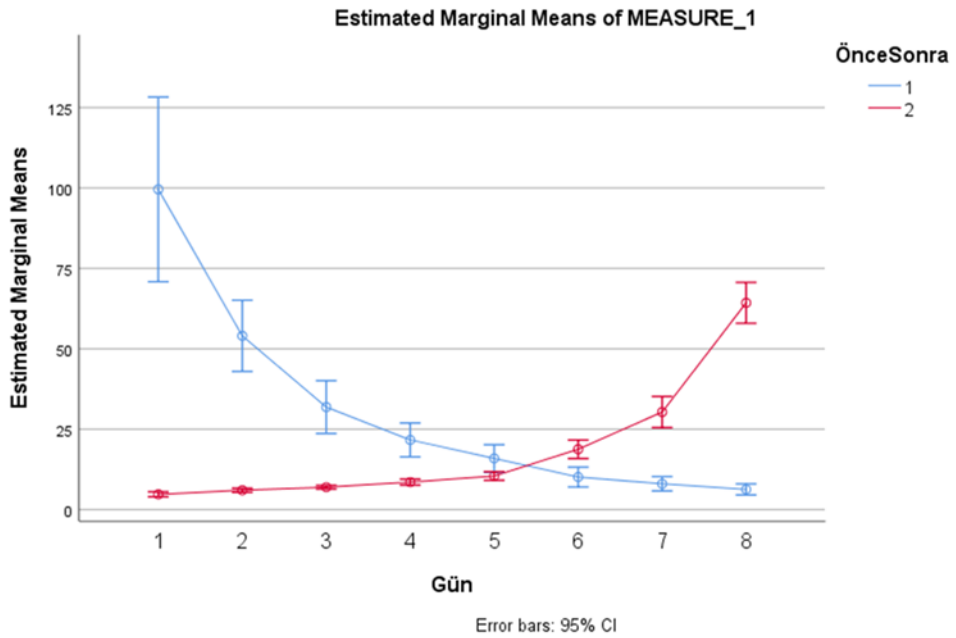
Tablo 6. Çalışma grubu PPA enjeksiyonu öncesi ve sonrası ortalama platformu bulma süreleri.

	Önce n=20 (Ort. ± S.S.) (min-max)	Sonra n=19 (Ort. ± S.S.) (min-max)	p
1.gün	96,80±59,24 (32-250)	4,74±1,59 (1-7)	,001*
2.gün	53,20±22,638 (18-105)	6,0±1,33 (3-9)	,001*
3.gün	32,05±16,615 (11-85)	6,95±1,17 (5-9)	,001*
4.gün	22,15±10,90 (10-49)	8,53±1,92 (5-13)	,001*
5.gün	16,35±8,81 (6-41)	10,42±2,73 (7-18)	,001*
6.gün	10,75±6,86 (5-31)	18,74±5,96 (10-30)	,001*
7.gün	8,75±5,62 (3-23)	30,32±10,05 (15-53)	,001*
8.gün	6,10±3,53 (3-20)	64,26±13,16 (46-89)	,001*

*p<0,05

Önce-Sonra zaman ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık vardır (p=0,001<0,05, F=22,978). Gün ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık vardır (p=0,001<0,05, F=28,728). Önce-Sonra*Gün etkileşiminde grup ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık vardır (p=0,001<0,05, F=69,820). Önce ve sonra grupları gün bazında incelendiğinde tüm günler ile fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,001<0,05) (Tablo 6).

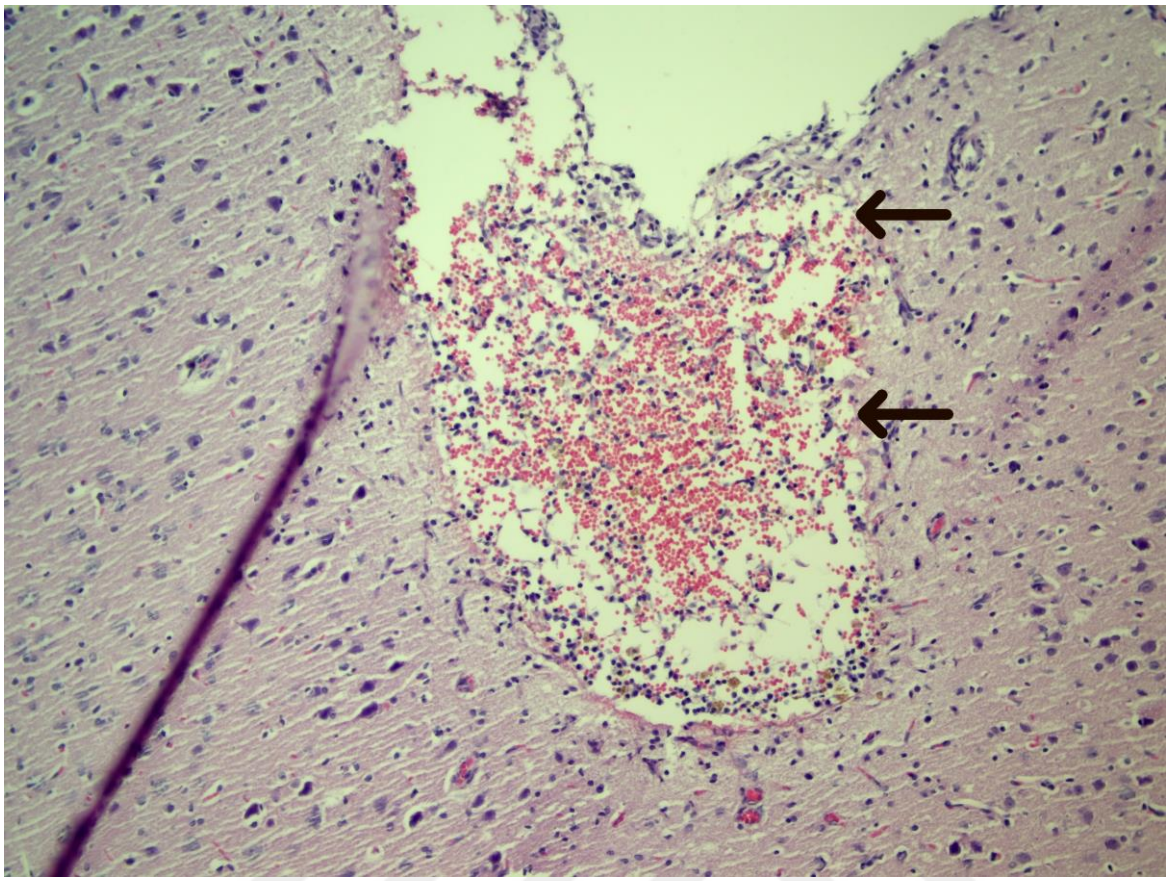
Önce grubunda 1.gün en yüksek ortalama mevcutken 1.günden sonra kademeli bir şekilde azalış olduğu, 8.gün en düşük ortalama süreye sahip olduğu saptandı. Sonra grubunda ise tam tersine en düşük ortalama süre 1.günde, 1.günden itibaren kademeli bir şekilde artış olduğu gözlendi (Grafik 1).



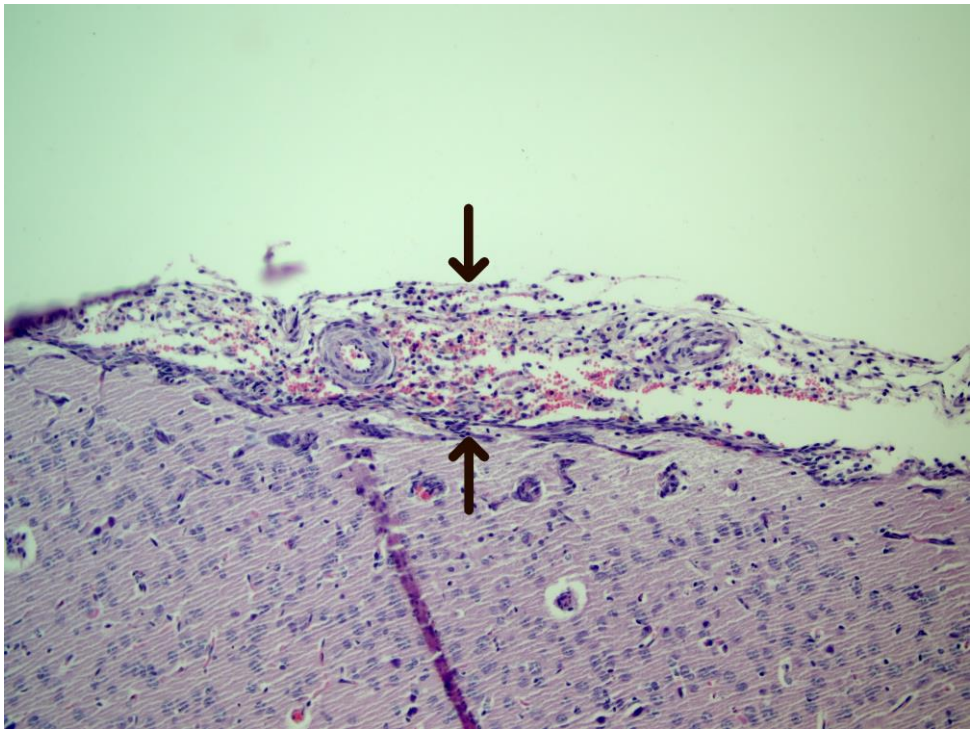
Grafik 1. Çalışma grubu PPA enjeksiyonu öncesi ve sonrası 16 günde ortalama platformu bulma süreleri.

4.2. Histopatolojik Bulgular

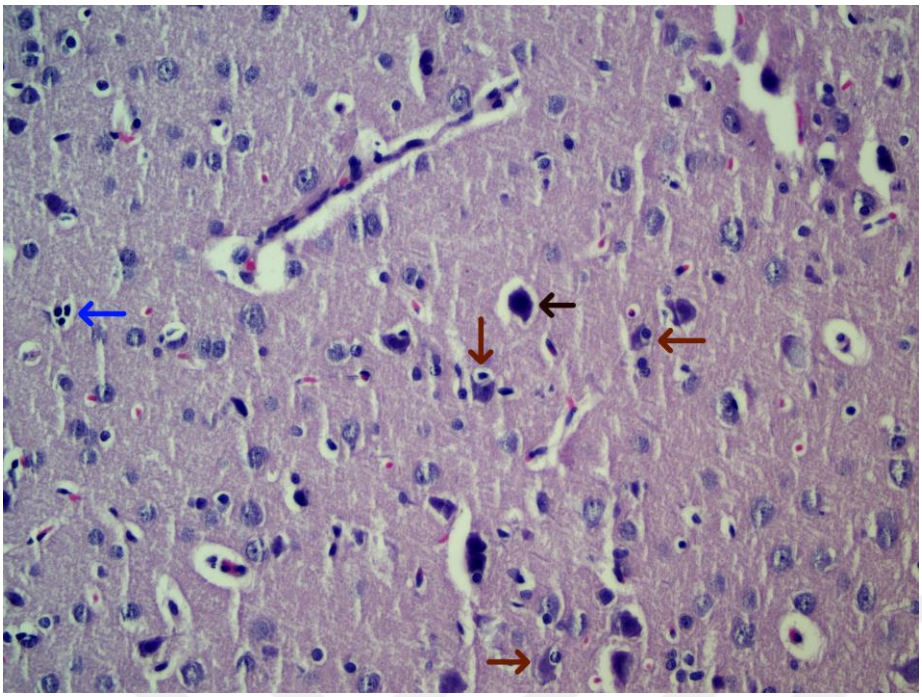
Çalışmaya dahil edilen hem kontrol (KG) hemde çalışma grubu (ÇG) ratların beyin, beyincik ve beyin kökünün makroskobik muayenesinde herhangi bir anormal bulguya rastlanılmadı. HE boyamasında çalışma grubundaki tüm ratların meninkslerinde hiperemi, bazılarında ise kanama ve yangısal reaksiyon izlendi (Şekil 6-7). Ayrıca ödem, kanama, nöronlarda dejenerasyon ve nekroz, nöronofaji ile gliozis gibi bulgulara rastlandı (Şekil 8). Kontrol grubu ratların serebral korteks bölümünde nöron sayısında artış olmaksızın nöropil dokuda hafif artış belirlendi. Bu bölgedeki özellikle pirimidal nöronların düzensiz bir oryantasyon gösterdiği gözlendi. Serebral korteksin beyaz maddesinin diğer katmanlardan ayrımında güçlük yaşandı. İki vakada (ÇG1 ve ÇG7) fokal malazi alanına rastlanıldı (Şekil 9). Ventrükuluslardaki ependimal ve subependimal bölgelerde hiperemi, kanama ve yer yer yangısal reaksiyonlar belirlendi.



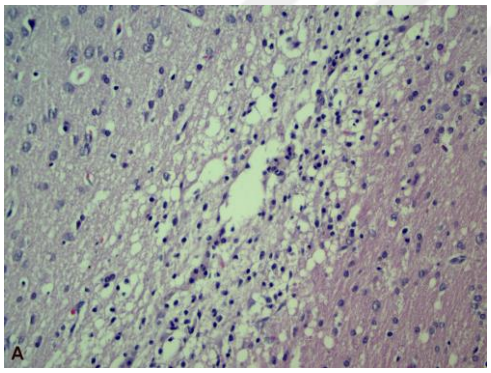
Şekil 6. Meninkslerde kanama ve inflamasyon, ÇG2, 20X, HE.

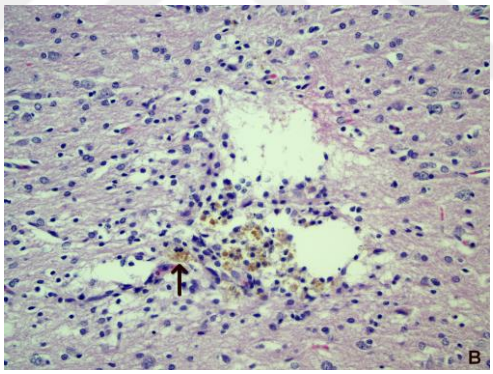


Şekil 7. Meninkslerde kanama, ödem ve inflamasyona bağlı kalınlaşma, 20X, HE.



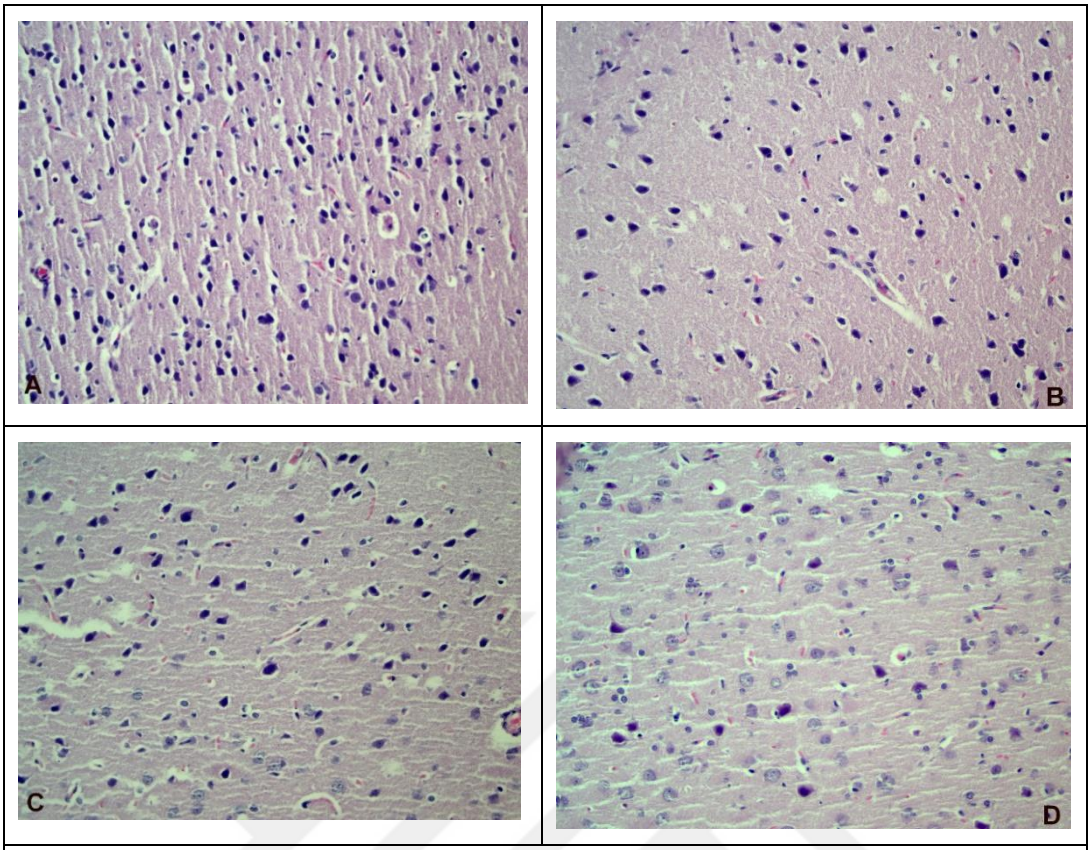
Şekil 8. Perinöronal ödem (siyah ok), nöronal dejenerasyon (mavi ok), nöronofaji (kırmızı ok) ve gliozis, 40X, HE.





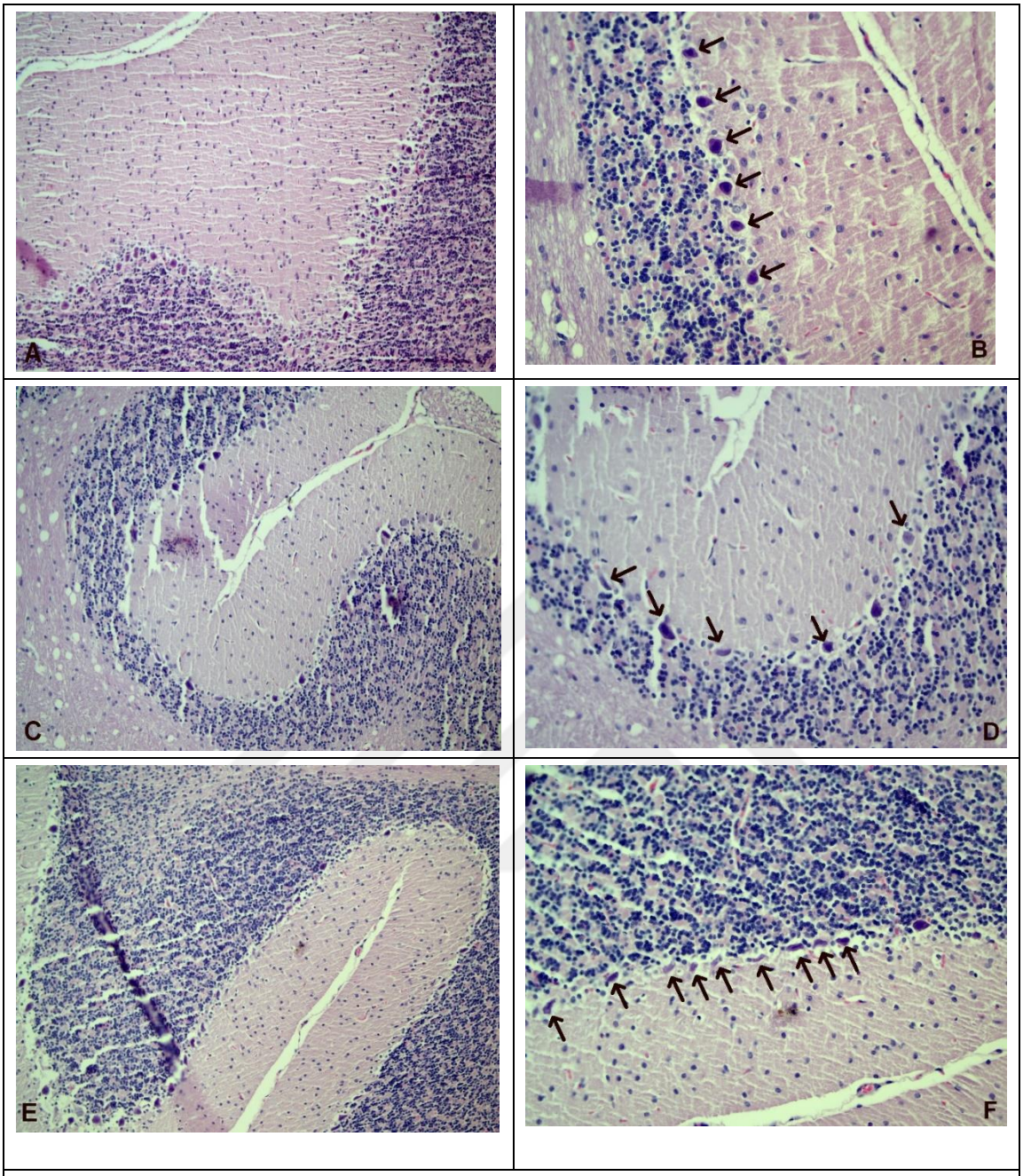
Şekil 9. Serebral korteksde fokal malazi alanları, **A:** ÇG1 grubu, **B:** ÇG7 grubu, lipofuksin pigmenti (ok), 40X, HE.

Serebral korteks ve hipokampal bölgedeki (özellikle CA1 ve CA3 bölgesi primidal katmandaki) dejenere nöronların küçük, piknotik ve hiperkromatik çekirdeklerle distrofik değişiklikler gösterdiği saptandı. Ayrıca bu nöronlarda düzensiz kromatoliz ve anormal Nissl granül dağılımı nedeniyle yoğunluklarının arttığı (koyu boyanma) belirlendi. Damarlarda dilatasyon ve hiperemi de gözlendi. Serebral korteksin özellikle eksternal granüler ve pramidal katmanlarındaki nöronların sayıca azaldığı belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Serebral korteksinde eksternal granüler-pramidal katmanındaki küçük ve orta büyüklükteki pramidal nöronlar, **A:** Normal nörönlar, KG5 grubu, **B:** Primidal nöronlarda azalma (hafif), ÇG11 grubu; **C:** Orta şiddette nörönal kayıp, ÇG8 grubu; **D:** Şiddetli nöronal kayıp, ÇG17 grubu, 40X, HE.

Çalışma grubu ratların serebellumlarında**,** Purkinje hücrelerinin sınırları düzensiz, eozinofilik sitoplazmaya ve belirgin olmayan piknotik küçük çekirdeklere sahip olduğunu gözlendi. Purkinje hücreleri çevresinde belirgin perinöronal boşluklar görüldü. Kayıp Purkinje hücrelerinin yerlerinde boş alanlar görülürken; granüler katman etkilenmemiş görünüyordu (Şekil 11).



Şekil 11. Purkinje (gangliyon) katmanı, serebellum. **A:** Normal Purkinje hücreleri, kontrol (1) grubu, X20; **B:** Normal Purkinje hücreleri (oklar), kontrol (1) grubu X40; **C,E:** Dejenere Purkinje hücreleri, çalışma grubu (1,2), X20; **D,F:** Dejenere Purkinje hücreleri, çalışma grubu (oklar), (1,2), X40, HE.

Cresyl violetle yapılan Nissl boyaması ile serabral korteks ve hipokampüs CA1 ve CA3 bölgesi pramidal katmanın kalınlığı ve hücre sayısı ile ilgili bilgiler Tablo 7'de sunuldu. Buna göre kontrol grubunda serebral korteks kalınlığının 480,24-543,27 mikrometre (μm), Çalışma grubunda 417,49-621,82 μm olarak bulundu. Çalışma grubunda hafif bir kalınlaşma gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 8). Hipokampüs CA1 bölgesi kalınlığı kontrol grubunda 23,94-26,1 μm, çalışma grubunda 11,82-28,89 μm olarak bulundu. İki grubun kıyaslamasında çalışma grubunun CA1 primidal katman kalınlığının önemli derecede azaldığı saptandı ($P<0,01$). Benzer şekilde bu bölgedeki hücre sayısı çalışma grubunda (59-110) kontrol grubuna (94-110) kıyasla anlamı derecede düşük bulundu ($P<0,01$). Hipokampüsün CA3 bölgesi primidal hücre katman kalınlığı kontrol grubunda 48,13-55,58 μm, çalışma grubunda 17,35-55,28 μm olarak belirlendi. İki grubun istatisksel karşılaştırılmasında çalışma grubunun CA3 primidal hücre katman kalınlığında önemli derecede azalma gözlendi ($P<0,01$). Bu katmandaki primidal hücre sayıları çalışma grubunda (43-265) kontrol grubuna (193-223) kıyasla istatistiki yönden önemli derece azaldığı bulundu ($P<0,01$) (Tablo 8) (Şekil 12).

Tablo 7. Gruplara göre serebral korteks kalınlığı, hipokampüs CA1 ve CA3 pramidal katman kalınlığı ve hücre sayısı ölçümlerinin sonuçları.

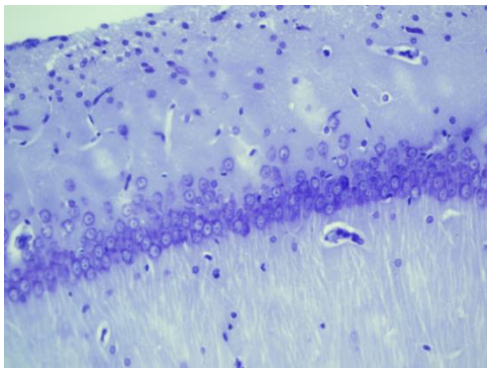
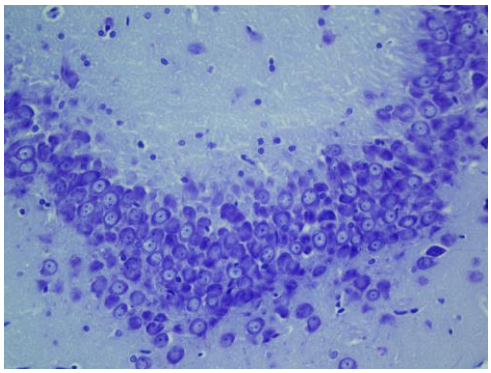
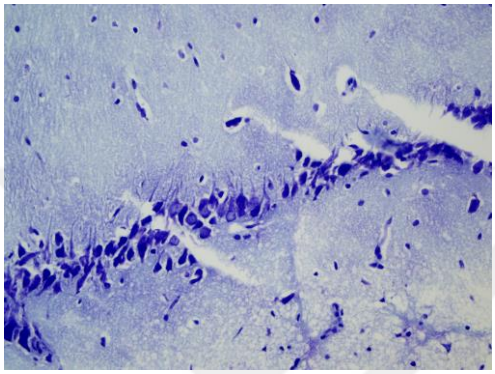
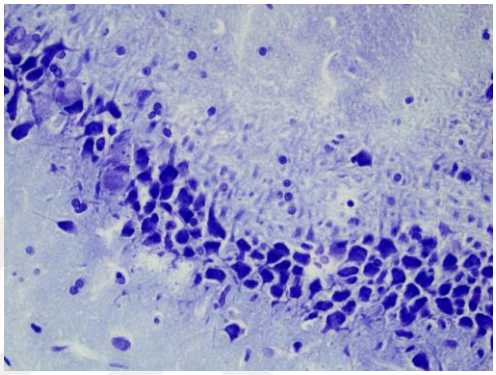
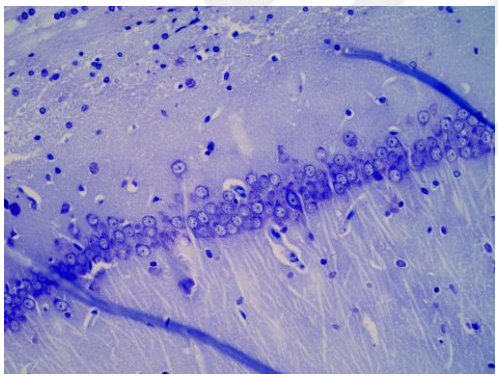
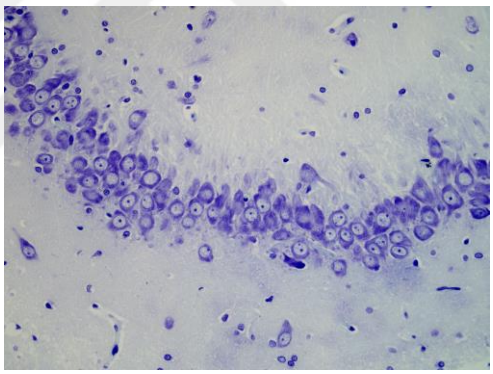
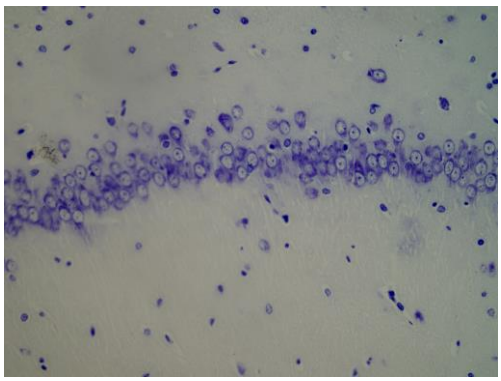
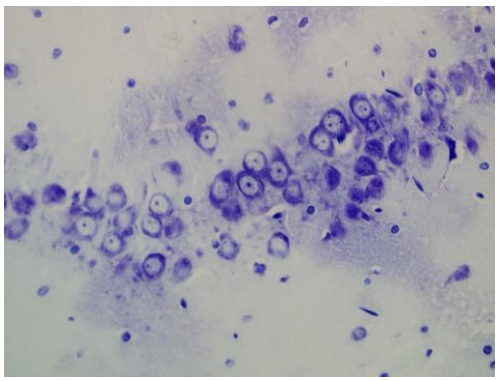
Deneme Grubu/ Numarası	Serebral korteks kalınlığı (μm)	Hipokampüs CA1 kalınlığı (μm)	Hipokampüs CA1 hücre sayısı	Hipokampüs CA3 kalınlığı (μm)	Hipokampüs CA3 hücre sayısı
KG1	517,84	25,29	103	48,13	210
KG2	480,24	26,1	94	53,58	223
KG3	503,25	23,94	99	50,58	215
KG4	528,38	25,83	110	40,39	193
KG5	543,27	25,22	101	49,94	213
ÇG1	584,45	14,94	71	23,05	82
ÇG2	589,6	15,25	76	28,23	86
ÇG3	417,49	16,68	84	31,74	91
ÇG4	612,72	17,12	78	25,26	83
ÇG5	551,22	19,42	75	33,48	95
ÇG6	488,64	16,44	77	20,43	86
ÇG7	621,82	16,66	77	31,12	94
ÇG8	536,22	15,51	73	28,78	85
ÇG9	496,22	17,01	81	26,45	84
ÇG10	615,62	17,35	71	30,7	77
ÇG11	529,54	28,89	108	55,28	265
ÇG12	455,26	14,34	59	24,01	92
ÇG13	483,39	17,9	71	36,8	101
ÇG14	447,84	12,48	65	26,45	87
ÇG15	453,6	11,82	75	17,35	69
ÇG16	478,84	14,2	67	24,25	73
ÇG17	483,33	15,49	77	25,11	99
ÇG18	481,8	14,35	69	24,24	43
ÇG19	557,22	14,97	74	28,56	82

Tablo 8. İncelenen parametrelerin istatistiksel sonuçları*

İncelenen Parametreler	Gruplar		P değeri
	Kontrol (n:5)	Çalışma (n:19)	
Serebral Korteks	514,60±10,80	520,25±14,46	P>0,05
Hipokampüs CA1-pramidal katman kalınlığı	25,27±0,37[b]	16,36±0,81[a]	P<0,01
Hipokampüs CA1-pramidal hücre sayısı	101,40±2,61[b]	75,15±2,25[a]	P<0,01
Hipokampüs CA3-pramidal katman kalınlığı	48,52±2,21[b]	28,49±1,82[a]	P<0,01
Hipokampüs CA3-pramidal hücre sayısı	210,80±4,94[b]	93,36±9,97[a]	P<0,01

* Sonuçlar ortalama ± standart hata ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) şeklinde verilmiştir.

[a-b] Bağımsız örneklem t testi testine göre aynı satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.

	Hipokampüs CA1	Hipokampüs CA3
Kontrol		
Çalışma 1		
Çalışma 6		
Çalışma 19		

Şekil 12. CA1 ve CA3 katmanlarının gruplara göre mikrofotoğrafları, hipokampüs, serebrum, X40, NS**.**

Her bir vakaya göre hipokampüs CA1 ve CA3 bölgelerindeki primidal hücrelerin boyanma yoğunluk değerleri Tablo 9'de sunuldu. Buna göre boyanma yoğunluklarının, CA1 bölgesi için minumum 125,45, maksimum 158,33; CA3 bölgesi için ise minimum 126,14, maksimum 164,13 olduğu bulundu. Bu iki değerin arasıdaki farkın 4 eşit aralığa bölünmesi ile belirlenen 4 farklı skor aralığı Tablo 10'de sunuldu. Her bir vaka bu skor aralıklarından hangisine düşüyor ise ona göre 1;2;3 ve 4 olarak skorlandı. Burada "4" çok yoğun (koyu) skoru, "1" ise az yoğun değeri ifade etmektedir. Vakaların aldığı skorlamalar da Tablo 9'de verildi. Hipokampüs CA1- pramidal katman yoğunlularının gruplara göre kıyaslaması sonucu çalışma grubundaki boyanma yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterdiği sapantandı ($P<0,05$). Benzer şekilde çalışma hipokampüs CA3- pramidal katmandaki hücrelerinde kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı istatistiksel olarak ortaya konuldu ($P<0,05$) (Tablo 11).

Tablo 9. Vakalara göre boyanma yoğunlukları ve skorlar.

Deneme grubu/ numarası	Hipokampüs CA1 pramidal katmanı boyanma yoğunluğu	Skor	Hipokampüs CA3 pramidal katmanı boyanma yoğunluğu	Skor
KG1	151,60	1	155,32	1
KG2	145,38	2	151,21	2
KG3	152,85	1	161,87	1
KG4	156,56	1	146,33	2
KG5	158,33	1	158,88	1
ÇG1	127,19	4	136,68	3
ÇG2	131,85	4	133,87	3
ÇG3	150,34	1	149,19	2
ÇG4	125,45	4	131,21	4
ÇG5	132,81	4	146,20	2
ÇG6	133,59	3	140,84	3
ÇG7	138,12	3	143,98	3
ÇG8	148,22	2	146,49	2
ÇG9	131,75	4	126,14	4
ÇG10	135,66	3	130,08	4
ÇG11	150,55	1	164,10	1
ÇG12	143,36	2	151,32	2
ÇG13	136,80	3	146,96	2
ÇG14	133,97	3	136,52	3
ÇG15	144,61	2	142,95	3
ÇG16	139,88	3	149,35	2
ÇG17	131,87	4	137,57	3
ÇG18	151,41	1	148,95	2
ÇG19	135,80	3	136,07	3

Tablo 10. Boyanma yoğunluklarına göre skor aralıkları.

CA1 bölgesi boyanma yoğunluğu aralıkları	Skor	CA3 bölgesi boyanma yoğunluğu aralıkları	Skor
125,45-133,67	4	126,14 -135,63	4
133,67-141,89	3	135,64 -145,13	3
141,89-150,11	2	145,14 -154,63	2
150,11 - 158,33	1	154,64 -164,13	1

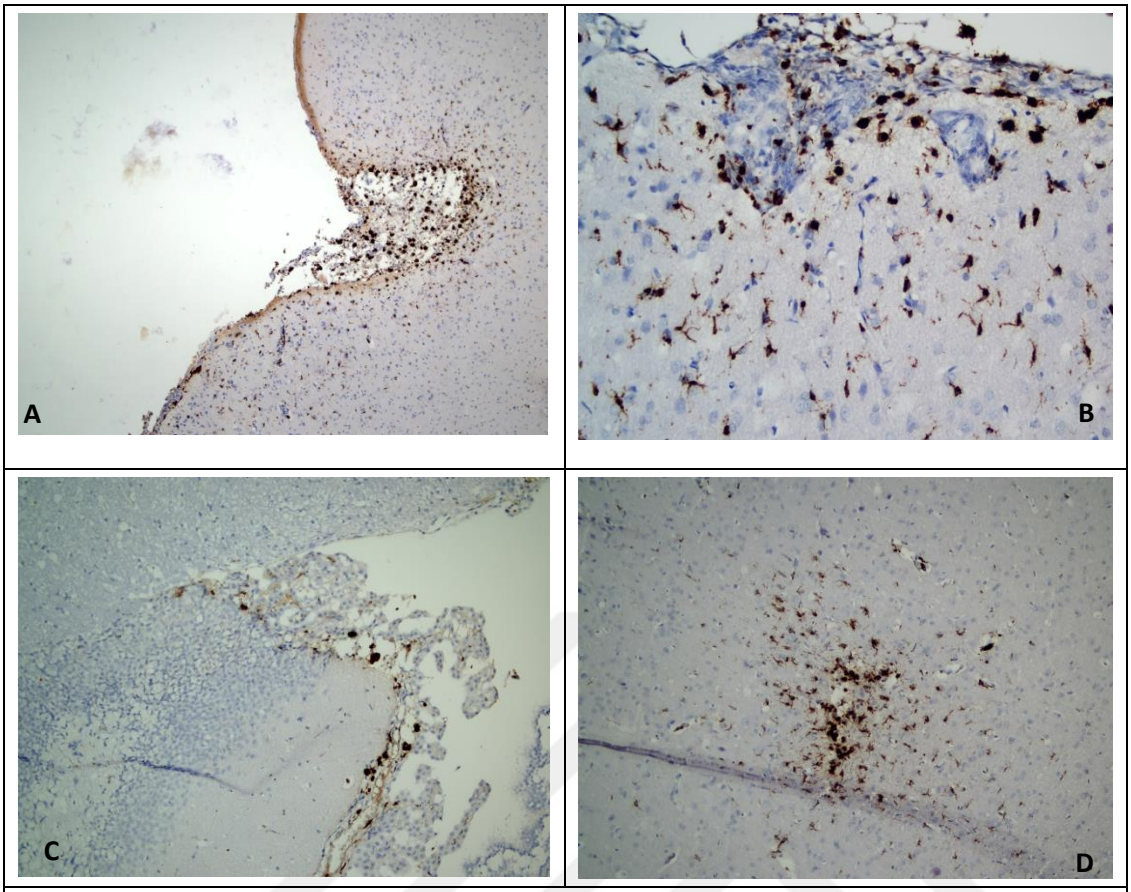
Tablo 11. Boyanma yoğunluklarına göre skorlamanın yapılması.

Boyanma Yoğunluğu	Gruplar		P değeri
	Kontrol (n:5)	Çalışma (n:19)	
Hipokampüs CA1-pramidal katman	1,2±0,2[a]	2,84±0,24[b]	P<0,05
Hipokampüs CA3-pramidal katman	1,4±0,54[a]	2,68±0,18[b]	P<0,05

[*] Sonuçlar ortalama ± standart hata ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) şeklinde verilmiştir.
[a-b] Bağımsız örneklem t testi testine göre aynı satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.

4.3. İmmunohistokimyasal bulgular

Monosit soyundaki immun hücrelerde yüksek oranda eksprese edilen bir protein olan CD68 için yapılan İHK boyamalarda hem kontrol hemde çalışma grubundaki ratların nöropil dokularında değerlendirelebilecek/skorlanabilecek bir immunoreaktiviteye rastlanılmadı. Bu gruplarda CD68 immunoreaktivitesine tüm vakalarda menikslerde, ventrikülar ependimal hücrelerinde, damar endotel hücrelerinde ve çok az sayıda vakada diğer bölgelerdeki mikroglial hücrelerde rastlanıldı. Bu reaksiyonun meninkslerden zaman zaman nöropil dokuya yayıldığı gözlendi. ÇG1, ÇG7 ve ÇG8 numaralı vakalarda serebral korteksde fokal alanlarda CD68 immunorekaktivitesi dikkati çekti (Şekil 13).



Şekil 13. CD68 immunoreaktivitesi. **A:** Meninkslerde yoğun CD68 immunboyaması, ÇG7, X20, DAB-Hematoksilen; **B:**Meninkslerden nöropil dokuya yayılan (serebral korteks) immunoreaktivite, ÇG13, X20, DAB-Hematoksilen; **C:** Subependimal bölgede immunorektivite, ÇG12, X20, DAB-Hematoksilen; **D:** Nöropil dokuda yoğun immunoreaktivite, ÇG8, X20, DAB-Hematoksilen.

GFAP'a yönelik yapılan İHK boyanması sonucu 40X büyütmede, 5 farklı alanda sayılan pozitif hücrelerin ortalamaları Tablo 12'de özetlendi. Astrosit ekspresyonunun önemli bir göstergesi olan GFAP pozitif hücre sayısının PPA uygulanan ratlarda hem serebral korteksde hem de hipokampal bölgede istatistiksel olarak önemli oranda artığı belirlendi ($P<0,01$) (Tablo 13) (Şekil 14-15)

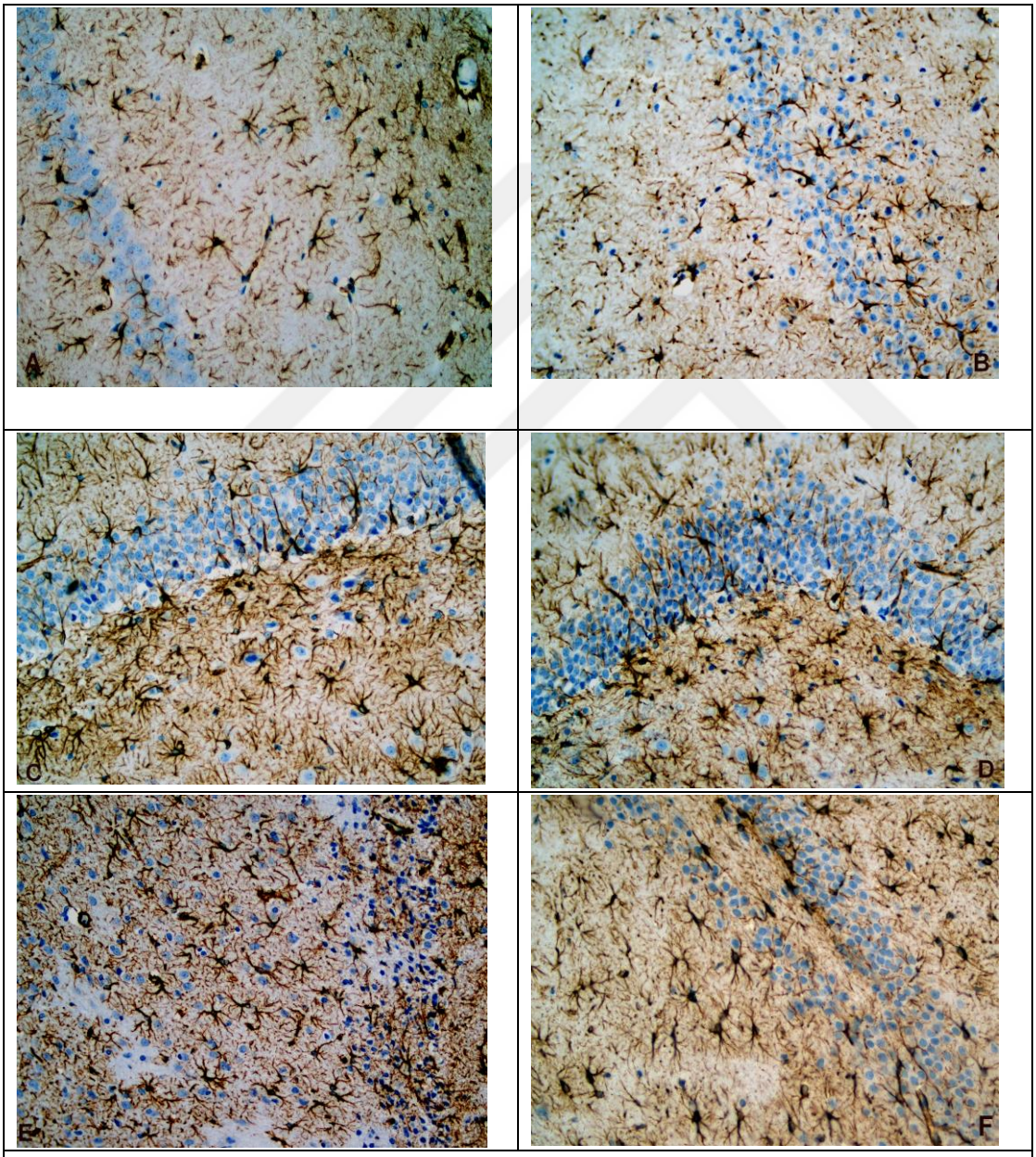
Tablo 12. Deneme grubu hayvanlarına göre GFAP immunoreaktivite sonuçları.

Deneme grubu/ numarası	Hipokampüs GFAP immunoreaktivitesi	Serebral korteks immunoreaktivitesi
KG1	41,25	45,4
KG2	38,00	44
KG3	50,00	47,2
KG4	36,75	57,8
KG5	41,75	50,4
ÇG1	53,75	71,8
ÇG2	52,50	70,2
ÇG3	61,50	76,8
ÇG4	59,25	65,6
ÇG5	60,75	88,8
ÇG6	62,50	69,2
ÇG7	62,25	67,8
ÇG8	62,50	63,2
ÇG9	60,50	72,4
ÇG10	62,50	61,4
ÇG11	62,75	62
ÇG12	57,25	78,2
ÇG13	67,00	66,4
ÇG14	65,50	76,2
ÇG15	61,50	65,2
ÇG16	58,50	57,6
ÇG17	63,25	72,4
ÇG18	60,75	76,6
ÇG19	62,75	66,6

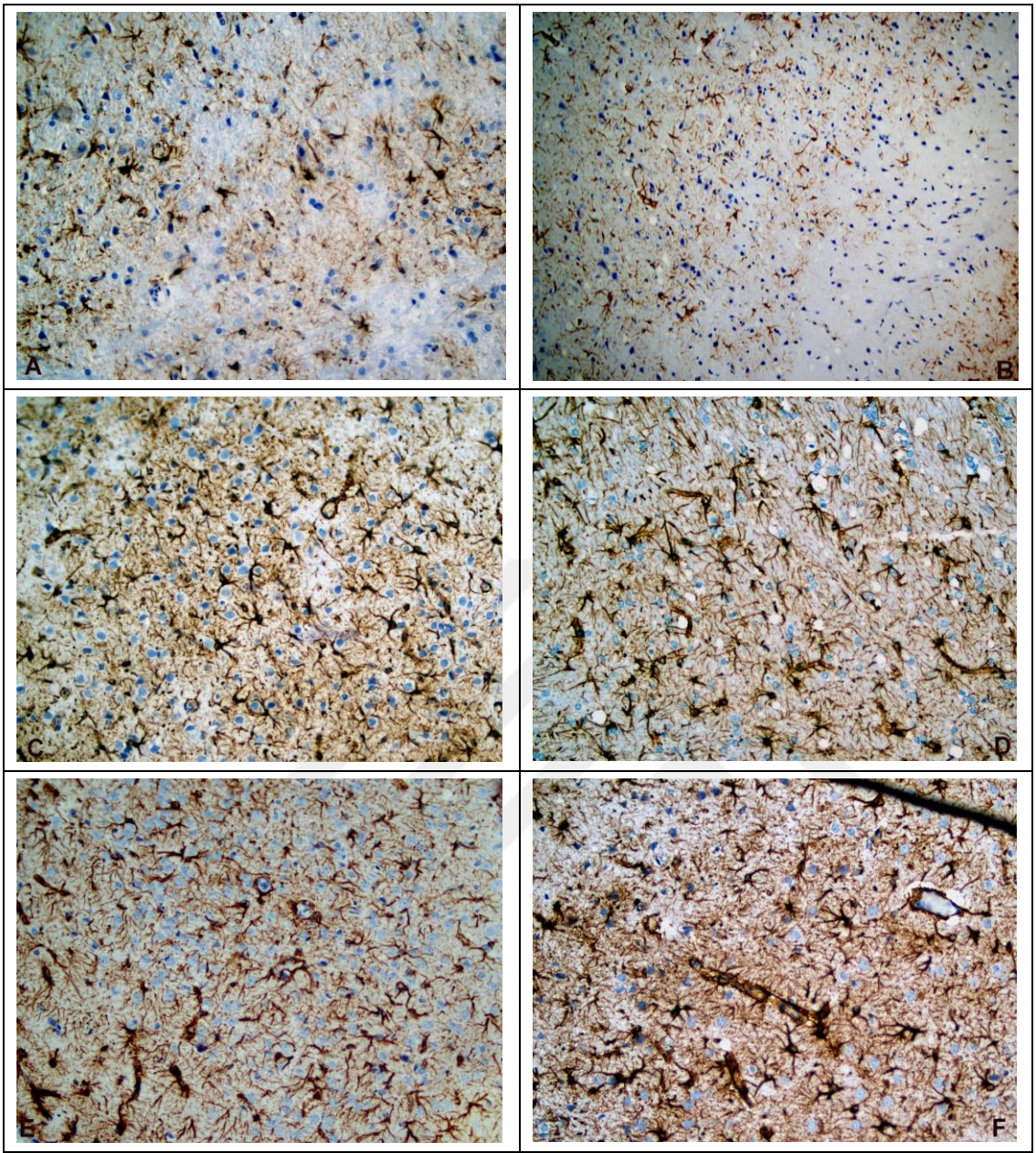
Tablo 13. GFAP immunoreaktivite sonuçlarının istastiksel gösterimi.*

GFAP immunoreaktivitesi	Gruplar		P değeri
	Kontrol (n:5)	Çalışma (n:19)	
Hipokampüs	41,55±2,31[a]	60,90±0,81[b]	P<0,01
Serebral korteks	48,96±2.45	69,91±1,68	P<0,01

* Sonuçlar ortalama ± standart hata ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) şeklinde verilmiştir.
[a-b] Bağımsız örneklem t testi testine göre aynı satırdaki ortak harfi taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir.



Şekil 14. GFAP immunorektivitesi, hipokampüs, X40, DAB-Hematoksilen; **A:** Kontrol 4; **B:** Kontrol 2; **C:** Çalışma 7; **D:** Çalışma 9; **E:** Çalışma13, **F:** Çalışma 3.



Şekil 15. GFAP immunorektivitesi, serebral korteks, X40, DAB-Hematoksilen; **A:** Kontrol 1; **B:** Kontrol 4; **C:**Çalışma 3; **D:** Çalışma 5; **E:** Çalışma 14, **F:** Çalışma 12.

5. TARTIŞMA

Otizm etiyopatolojisi genetik hastalıklar, natal faktörler, nöroanatomik faktörler, genetik faktörler, nörokimyasal faktörler, immün faktörler, çevre faktörleri vb. altında incelense de halen etiyopatolojisi belirlenememiş nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizmin etiyopatolojisinin belirlenmesi bireyler açısından önemli olduğu kadar onlarla ilgilenen ailesi içinde oldukça önemlidir. Ebeveynin etiyopatolojisi belli olmayan bir bozukluk için gösterdiği manevi ve maddi yıpranma göz ardı edilmemelidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, insanlar üzerinde çalışmanın zorluğundan dolayı valproik asit, lipopolisakkarit, PPA ve bağırsak mikrobiyotasını hedef alan gaita transferleri ile deneysel OSB modelleri oluşturulmaktadır (Schneider 2005, El-Ansary ve ark 2011, Foley ve ark 2014, Foley ve ark 2014, Kirsten ve Bernardi 2017, Bilbo ve ark 2018, Choi ve ark 2018, Sharon ve ark 2019). Oluşturulan bu modellerde modelin oluşup olmadığını anlamak için önce davranış testleri ve sonrasında çalışılacak kan, doku, organ vb. üzerinde incelemeler yapılmaktadır.

Bağırsak mikrobiyotası normal koşullarda denge halindedir. Ancak çeşitli etkilerden dolayı bu denge bozulmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen bu dengesizlikten dolayı bakteri sayı ve çeşitliliği da değişkenlik göstermektedir. Bakterilerin oluşturdukları metabolit ürünleri bu dengesizliğe bağlı olarak azalmakta ya da artmaktadır. Bakteriyel metabolit ürünü olan PPA, KBB'yi geçebilmektedir. KBB'yi geçen PPA ile beyinde bir nöroenflamasyon başlamaktadır. Bu nöroenflamasyona bağlı olarak astrosit sayısında artış, mikroglia aktivasyonu, miyelin kaybı, nöron yapılarında değişikler ve purkinje hücrelerinde azalmalar gözlenmektedir. Bu çalışmada da OSB'li bireylerin bağırsak mikrobiyotasında oluşan disbiyozis sonucu beyinde meydana gelen nöroenflamasyon ratlar üzerinde deneysel olarak çalışıldı.

Deneysel hayvan modellemelerinde nörobiyoloji, nörofarmakoloji ve nörobilişsel bozuklukların çalışmasında hipokampal bağımlı öğrenme ve hafızayı test etmek için Morris su testi, üç çember sosyabilite testi ve direk sosyabilite testi gibi çeşitli testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Nörogelişimsel bir bozukluk olan OSB modellemelerinde de modelin oluşup oluşmadığını anlamak için kimyasal madde transferi öncesi ve sonrası hayvanların gösterdiği davranışsal değişiklikler belirlenmektedir (MacFabe ve ark 2011, Sharon ve ark 2019). Kanada' da yapılmış bir çalışmada PPA ile oluşturulan deneysel otizm modelinde bilişsel ve motorik aktiviteyi değerlendirmek için 50 adet yetişkin erkek *Long Evans* sıçan üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada 20 erkek rata PPA verilmiş ve kontrollere kıyasla negatif

davranışlar sergilediği (F (9, 405) = 11,920, p <0,01) belirlenmiştir (Shultz ve ark 2009). Bir diğer çalışmada i.s.v. olarak verilen PPA ile oluşturulan deneysel otizm modelinde 47 adet yetişkin erkek *Long Evans* sıçan kullanılmıştır. Bu çalışmada adölesan 20 erkek rata (PPA) 41 ± 4 gün boyunca uygulanmıştır. Yapılan davranış testleri (T-labirent görevi, nesneye yönelim, sosyal davranış testi) sonucunda PPA verilen ratların (n:20) fosfat tamponlu salin verilen kontrollere (n:27)göre negatif davranışlar sergilediği (F(1,25) = 12,6, p = 0,017) belirlenmiştir (MacFabe ve ark 2011).

Morris su tankı ile gerçekleştirilen davranış testi sonuçları değerlendirildiğinde PPA enjeksiyonu önce-sonra zaman ortalamaları (p=0,001<0,05, F=22,978) ve gün ortalamaları (p=0,001<0,05, F=28,728) arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi. Ayrıca önce-Sonra*Gün etkileşiminde grup ortalamaları arasında da istatistik olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur (p=0,001<0,05, F=69,820). Önce ve sonra grupları gün bazında incelendiğinde tüm günler ile fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,001<0,05). Önce grubunda 1.gün en yüksek ortalama mevcutken 1.günden sonra kademeli bir şekilde azalış olduğu, 8.gün en düşük ortalama süreye sahip olduğu saptandı. Sonra grubunda ise tam tersine en düşük ortalama süre 1.günde, 1.günden itibaren kademeli bir şekilde artış olduğu gözlendi. Deneysel OSB modellemesi üzerine yapılan araştırmalar ve çalışmamızın davranış testi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde i.s.v. PPA enjeksiyonu hayvanlarda OSB benzeri davranış bozuklukları oluşturmakta ve modellerin bilişsel, sosyal ve davranışlarında negatif sonuçlar doğurmaktadır.

Davranışsal bozukluklara ek olarak meydana gelen patolojik değişikliklerde OSB'de beyin hacmindeki artışın temelde beynin serebral korteks, serebellum ve limbik yapılardaki beyaz ve gri madde artışına bağlı olduğu yönündedir. Beynin farklı lobları ele alındığında hacim artışı sırasıyla en çok frontal, temporal ve paryetal loblarda olmaktadır. En yüksek hacim artışının saptandığı frontal lobu ayrıntılı olarak incelendiğinde özellikle dorsolateral prefrontal korteks ve medyal frontal kortekste hacim artışı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda anterior singulat girusun korteksi , hipokampüs, amigdala, subikulum, septal çekirdekler, mamiller cisimcik, gibi çeşitli ön beyin bölgelerinde, hücrelerin yapısında değişiklikler ve daha küçük olduğu tespit edilmiştir. (Kemper ve Bauman 1998, Carper ve Courchesne 2000, Carper ve ark 2002, Sparks ve ark 2002, Carper ve Courchesne 2005, MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011, Liddelow ve ark 2017).

Mevcut çalışmada serebral korteks ve hipokampal bölgedeki (özellikle CA1 ve CA3 bölgesi primidal katmandaki) dejenere nöronların küçük, piknotik ve hiperkromatik

çekirdeklerle distrofik değişiklikler gösterdiği saptandı. Ayrıca bu nöronlarda düzensiz kromatoliz ve anormal Nissl granül dağılımı nedeniyle yoğunluklarının arttığı belirlendi. Damarlarda dilatasyon ve hiperemi de gözlendi. Serebral korteksin özellikle eksternal granüler ve pramidal katmanlarındaki nöronların sayıca azaldığı belirlendi. PPA ile beyinde meydana gelen hasar sonucunda elde edilen veriler ve diğer çalışmalara paralel olarak serebral korteks ve hipokampüsde nöronal kayıplar nöron yapısında değişikler meydana geldiği düşünülmektedir.

Serebellumda purkinje hücre yoğunluğunda azalma, dentate çekirdekte anormallikler, olivari hücrelerinin konvolusyonun periferine doğru toplanma eğilimleri, inferior olivari ve serebellar çekirdek nöron sayısında ve boyutunda değişiklikler tespit edilmiştir (Bauman ve Kemper 1985, Kemper ve Bauman 1993, MacFabe ve ark 2007, Shultz ve ark 2008, Shultz ve ark 2009, MacFabe ve ark 2011). Bu çalışmada çalışma grubu ratların serebellumlarında, purkinje hücrelerinin sınırları düzensiz, eozinofilik sitoplazmaya ve belirgin olmayan piknotik küçük çekirdeklere sahip olduğunu gözlendi. Purkinje hücreleri çevresinde belirgin perinöronal boşluklar görüldü. Kayıp purkinje hücrelerinin yerlerinde boş alanlar görülürken; granüler katman etkilenmemiş şekilde belirlendi. Nöropatolojik çalışmalar ve çalışma verilerimiz doğrultusunda serebellumda purkinje sayısında azalma ve perinöronal boşluklar görülmesi söz konusudur.

PPA'nın beyne i.s.v. enjeksiyonu ile deneysel OSB modeli oluşturulan çalışmalarda alınan beyin dokusunda biyokimyasal ve immünohistokimya analizler yapılmıştır. Biyokimyasal analizler sonucunda oksidatif stres belirteçlerinde (lipid peroksidasyon ve protein karbonilasyon) ve glutatyon S-transferaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Buna ek olarak glutatyon ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde bir azalma meydana gelmiştir. Ancak GFAP immünoreaktivitesinde ($t(9) = -3{,}13$, $p < 0{,}5$) önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu artışın en çok hipokampüste meydana geldiğini ve beyaz maddede anlamlı olmayan bir eğilimin de olduğunu belirtmişlerdir. Mikroglia belirteci CD68 için de benzer bulguların meydana geldiğini daha fazla sayıda hipokamüsde ($t(9) = -4{,}44$, $p < 0{,}1$) ve beyaz madde ($t(9) = -3{,}07$, $p < 0{,}5$) aktif mikroglia olduğu da belirtilmiştir (MacFabe ve ark 2007). Yapılan başka bir çalışmada 114 yetişkin erkek rat beyni kalitatif analizi doğrultusunda tüm bölgelerde astrositlerin hipertrofisi görülmüştür. Hipokampal piramidal hücrelerde değişiklikler tespit edilmemiştir. Beyin dokusunun kantitatif görüntü analizi ele alındığında astrosit ekspresyonunun önemli bir göstergesi olan GFAP pozitif hücre sayısının PPA uygulanan ratlarda hem serebral korteksde hem de hipokampal bölgede kontrollere kıyasla (PPA, 54,0± 4,24; PBS, 59,2 ± 5,5) istatistiksel olarak önemli oranda artığı belirlenmiştir. Ayrıca CA3'de

PPA' ya bağlı olarak için önemsiz bir eğilim tespit edilmiştir (Shultz ve ark 2008). Bilişsel ve motorik aktiviteyi değerlendirmek için PPA verilen ratlardan alınan beyin dokusunun analizi sonucu CA3 bölgesinde ($F(1, 14) = 12,56$, $p < 0,1$) ve hipokampüsün CA1/CA2 bölgesi ve eksternal kapsülde ($F(1, 14) = 21,83$, $p < 0,01$) GFAP immünoreaktivitesi artış göstermiştir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak önemli bir CA3, girus ($F(1, 10) = 11,27$, $p < 0,1$) ve beyaz madde bölgesinde ($F(1, 10) = 15,90$, $p < 0,1$) CD68 için mikroglia aktivasyonu tespit edilmiştir. Yapılan boyamalar doğrultusunda ilgili bölgelerde daha yoğun boyanma özellikle beyaz maddede ve perivasküler bölgelerde daha yoğun bir boyanma gözlenmiştir (Shultz ve ark 2009). Adölesan ve yetişkin ratlar üzerinde PPA ile deneysel otizm modeli oluşan ratların beyinlerin kalitatif görüntü analizi değerlenmiştir. Tüm bölgelerde reaktif astrositler ve aktive mikroglia varlığı tespit edilmiştir. Adölesan ratlara ait hipokampüs ve beyaz maddede incelenen GFAP ve CD68 immünoreaktivitesinin yetişkin ratlarda artmış olduğu belirlenmiştir. PPA verilen adölesan ratlarda hipokampüsün CA1/CA2 bölgesinde ($F(1,37) = 3,4$, $p = 0,28$) ve beyaz maddeinde immünoreaktivite ve CD68'deki $F(1,37) = 2,5$, $p = 0,6$) artış belirlenmiştir. Adölesan ratların hipokampal piramidal hücrelerin kaybı belirlenememiştir (MacFabe ve ark 2011).

Çalışmamızda CD68 ve GFAP'ye yönelik yapılan immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde ise; CD68 için yapılan İHK boyamalarda hem kontrol hemde çalışma grubundaki ratların CD68 immunoreaktivitesine tüm vakalarda menikslerde, ventrikülar ependimal hücrelerinde, damar endotel hücrelerinde ve çok az sayıda vakada diğer bölgelerdeki mikroglial hücrelerde rastlanıldı. Bu reaksiyonun meninkslerden zaman zaman nöropil dokuya yayıldığı gözlendi. ÇG1, ÇG7 ve ÇG8 numaralı vakalarda serebral korteksde fokal alanlarda CD68 immunorekaktivitesi dikkati çekti. Astrosit ekspresyonunun önemli bir göstergesi olan GFAP pozitif hücre sayısının PPA uygulanan ratlarda hem serebral korteksde (69,91±1,68) hem de hipokampal bölgede(60,90±0,81) istatistiksel olarak önemli oranda artığı belirlendi ($P<0,01$). Cresyl violetle yapılan Nissl boyaması ile serabral korteks ve hipokampüs CA1 ve CA3 bölgesi pramidal katmanın kalınlığı kontrol grubunda serebral korteks kalınlığının 480,24-543,27 μm, çalışma grubunda 417,49-621,82 μm olarak bulundu. Çalışma grubunda hafif bir kalınlaşma gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hipokampüs CA1 bölgesi kalınlığı kontrol grubunda 23,94-26,1 μm, çalışma grubunda 11,82-28,89 μm olarak bulundu. İki grubun kıyaslamasında çalışma grubunun CA1 primidal katman kalınlığının önemli derecede azaldığı saptandı ($P<0,01$). Benzer şekilde bu bölgedeki hücre sayısı çalışma grubunda (59-110) kontrol grubuna (94-110) kıyasla anlamı derecede düşük bulundu ($P<0,01$). Hipokampüsün CA3 bölgesi primidal

hücre katman kalınlığı kontrol grubunda 48,13-55,58 μm, çalışma grubunda 17,35-55,28 μm olarak belirlendi. İki grubun istatisksel karşılaştırılmasında çalışma grubunun CA3 primidal hücre katman kalınlığında önemli derecede azalma gözlendi (P<0,01). Bu katmandaki primidal hücre sayıları çalışma grubunda (43-265) kontrol grubuna (193-223) kıyasla istatistiki yönden önemli derece azaldığı bulundu (P<0,01). Her bir vakaya göre hipokampüs CA1 ve CA3 bölgelerindeki primidal hücrelerin boyanma yoğunluklarının, CA1 bölgesi için minumum 125,45, maksimum 158,33; CA3 bölgesi için ise minimum 126,14, maksimum 164,13 olduğu bulundu. Hipokampüs CA1 pramidal katman yoğunlularının gruplara göre kıyaslaması sonucu çalışma grubundaki boyanma yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterdiği saptandı (P<0,05). Benzer şekilde çalışma hipokampüs CA3 pramidal katmandaki hücrelerinde kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı istatistiksel olarak ortaya konuldu (P<0,05). Yapılan diğer çalışmalarda CA1/CA2 ve CA3 bölgesi ayrı olarak ele alınmıştır. Bizim çalışmamız ve diğer çalışmalarda çalışma grubundaki ratlardan alınan beyin dokusunun immünohistokimyasal analizi, reaktif astrogliosis (GFAP) aktive olmuş mikroglia varlığı (CD68) tespit edilmiş, nöroinflamatuvar yanıt oluştuğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, PPA verilen ratlarda OSB ile ilgili davranışsal ve beyin olaylarına ilişkin önceki bulgularla tutarlıdır ve hayvanlarda benzer etkiler oluşturarak PPA'nın kemirgenlerdeki etkilerinin daha fazla çalışılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak OSB bir duvarda yer alan büyük bir yapboza benzemektedir. Duvardaki resmin doğru olarak görünüp tamamının algılanması gerekmektedir. Aksi takdirde büyük resmi oluşturan parçalardan herhangi birinin eksikliğinde, o parçanın resmin bütünlüğünü tamamlayacak şekilde, doğru yere, doğru şekilde konulması mümkün olamamaktadır. OSB'nin insan üzerinde etiyopatolojisini ve uygun tedavi yöntemlerini çalışmak zordur. Etiyopatolojisini açıklamak için uygun tedavi yöntemleri geliştirilmelidir. Uygun tedavi yöntemlerinin yanı sıra etiyopatolojisini açıklamak için deneysel OSB modeli üzerinde çalışılmalıdır. Etiyolojik sebeplerinin ve beyin dokusu, bağırsak mikrobiyotası gibi doku ve organlarda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesine ve aydınlatılmasına katkıda bulunulması gerekmektedir. Bu çalışmada PPA ile oluşturulan deneysel OSB modeli ile meydana gelen nöroenflamasyon, mikroglia aktivasyonu ve nöronal kayıplar açıklanarak OSB'nin etiyopatolojisine katkı sağlama ümidindeyiz.

7. KAYNAKLAR

Abell F, Krams M, Ashburner J, Passingham R, Friston K, Frackowiak R, Happe F, Frith C, Frith U, 1999. The neuroanatomy of autism: a voxel-based whole brain analysis of structural scans. Neuroreport, 10, 8, 1647-51.

Abrahams BS, Geschwind DH, 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. Nat Rev Genet, 9, 5, 341-55.

Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA, 2011. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. BMC Gastroenterol, 11, 22.

Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K, 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. Biochim Biophys Acta, 1801, 11, 1175-83.

Altieri L, Neri C, Sacco R, Curatolo P, Benvenuto A, Muratori F, Santocchi E, Bravaccio C, Lenti C, Saccani M, Rigardetto R, Gandione M, Urbani A, Persico AM, 2011. Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. Biomarkers, 16, 3, 252-60.

Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW, 2008. Neuroanatomy of autism. Trends Neurosci, 31, 3, 137-45.

Ameis SH, Szatmari P, 2012. Imaging-genetics in autism spectrum disorder: advances, translational impact, and future directions. Front Psychiatry, 3, 46.

Anders JJ, 1988. Lactic acid inhibition of gap junctional intercellular communication in in vitro astrocytes as measured by fluorescence recovery after laser photobleaching. Glia, 1, 6, 371-9.

Anderson CM, Swanson RA, 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia, 32, 1, 1-14.

Anthony DC, Couch Y, Losey P, Evans MC, 2012. The systemic response to brain injury and disease. Brain Behav Immun, 26, 4, 534-40.

Araque A, Navarrete M, 2010. Glial cells in neuronal network function. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 365, 1551, 2375-81.

Arentsen T, Qian Y, Gkotzis S, Femenia T, Wang T, Udekwu K, Forssberg H, Diaz Heijtz R, 2017. The bacterial peptidoglycan-sensing molecule Pglyrp2 modulates brain development and behavior. Mol Psychiatry, 22, 2, 257-66.

Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM, 2005. The teratology of autism. Int J Dev Neurosci, 23, 2-3, 189-99.

Arneson CL, Durkin MS, Benedict RE, Kirby RS, Yeargin-Allsopp M, Van Naarden Braun K, Doernberg NS, 2009. Prevalence of cerebral palsy: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, three sites, United States, 2004. Disabil Health J, 2, 1, 45-8.

Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffer PJ, Rudensky AY, 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature, 504, 7480, 451-5.

Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, Ozonoff S, Pessah IN, Van de Water J, 2008. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. J Neuroimmunol, 204, 1-2, 149-53.

Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J, 2011. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. Brain Behav Immun, 25, 1, 40-5.

Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J, 2011. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. J Neuroimmunol, 232, 1-2, 196-9.

Ashwood P, Kwong C, Hansen R, Hertz-Picciotto I, Croen L, Krakowiak P, Walker W, Pessah IN, Van de Water J, 2008. Brief report: plasma leptin levels are elevated in autism: association with early onset phenotype? J Autism Dev Disord, 38, 1, 169-75.

Ashwood P, Van de Water J, 2004. Is autism an autoimmune disease? Autoimmun Rev, 3, 7-8, 557-62.

Ashwood P, Wills S, Van de Water J, 2006. The immune response in autism: a new frontier for autism research. J Leukoc Biol, 80, 1, 1-15.

Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET, 2010. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord, 40, 12, 1423-30.

Auranen M, Nieminen T, Majuri S, Vanhala R, Peltonen L, Jarvela I, 2000. Analysis of autism susceptibility gene loci on chromosomes 1p, 4p, 6q, 7q, 13q, 15q, 16p, 17q, 19q and 22q in Finnish multiplex families. Mol Psychiatry, 5, 3, 320-2.

Averina OV, Danilenko VN, 2017. Human Intestinal Microbiota: Role in Development and Functioning of the Nervous System. Mikrobiologiia, 86, 1, 5-24.

Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R, 1998. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. Mol Med, 4, 4, 217-30.

Bachevalier J, 1996. Brief report: medial temporal lobe and autism: a putative animal model in primates. J Autism Dev Disord, 26, 2, 217-20.

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI, 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science, 307, 5717, 1915-20.

Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, Araujo TG, Carvalho BM, Rocha GZ, Vecina JF, Calisto K, Guadagnini D, Prada PO, Santos A, Saad STO, Saad MJA, 2017. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. J Nutr Biochem, 50, 16-25.

Bagdasarian N, Rao K, Malani PN, 2015. Diagnosis and treatment of Clostridium difficile in adults: a systematic review. JAMA, 313, 4, 398-408.

Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Robinson Rosenberg C, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, Constantino JN, Vehorn A, Shenouda J, Hall-Lande J, Van Naarden Braun K, Dowling NF, 2018. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. MMWR Surveill Summ, 67, 6, 1-23.

Baker JP, 2013. Autism at 70--redrawing the boundaries. N Engl J Med, 369, 12, 1089-91.

Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW, 1994. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. J Neurosci, 14, 2, 846-56.

Barger BD, Campbell JM, McDonough JD, 2013. Prevalence and onset of regression within autism spectrum disorders: a meta-analytic review. J Autism Dev Disord, 43, 4, 817-28.

Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J, Santangelo SL, Searby C, Sheffield V, Singleton J, Slager S, et al., 1999. An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism. Am J Med Genet, 88, 6, 609-15.

Bauman M, Kemper TL, 1985. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. Neurology, 35, 6, 866-74.

Baune BT, Dannlowski U, Domschke K, Janssen DG, Jordan MA, Ohrmann P, Bauer J, Biros E, Arolt V, Kugel H, Baxter AG, Suslow T, 2010. The interleukin 1 beta (IL1B) gene is associated with failure to achieve remission and impaired emotion processing in major depression. Biol Psychiatry, 67, 6, 543-9.

Bavaresco CS, Zugno AI, Tagliari B, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT, 2004. Inhibition of Na+, K+-ATPase activity in rat striatum by the metabolites accumulated in Lesch-Nyhan disease. Int J Dev Neurosci, 22, 1, 11-7.

Belkaid Y, Hand TW, 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell, 157, 1, 121-41.

Bergersen L, Rafiki A, Ottersen OP, 2002. Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. Neurochem Res, 27, 1-2, 89-96.

Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A, 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. Glia, 55, 3, 233-8.

Beyer KS, Blasi F, Bacchelli E, Klauck SM, Maestrini E, Poustka A, International Molecular Genetic Study of Autism C, 2002. Mutation analysis of the coding sequence of the MECP2 gene in infantile autism. Hum Genet, 111, 4-5, 305-9.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW, 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends Neurosci, 30, 11, 596-602.

Bilbo SD, Block CL, Bolton JL, Hanamsagar R, Tran PK, 2018. Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. Exp Neurol, 299, Pt A, 241-51.

Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ, 2009. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? Glia, 57, 12, 1251-64.

Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu MC, 2013. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011-2012. Natl Health Stat Report, 65, 1-11, 1 p following

Borgstrom MK, Edwardsson S, Svensater G, Twetman S, 2000. Acid formation in sucrose-exposed dental plaque in relation to caries incidence in schoolchildren. Clin Oral Investig, 4, 1, 9-12.

Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF, 2014. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. Trends Mol Med, 20, 9, 509-18.

Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P, Gulyas B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S, 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. Sci Transl Med, 6, 263, 263ra158.

Brass EP, Beyerinck RA, 1987. Interactions of propionate and carnitine metabolism in isolated rat hepatocytes. Metabolism, 36, 8, 781-7.

Brass EP, Beyerinck RA, 1988. Effects of propionate and carnitine on the hepatic oxidation of short- and medium-chain-length fatty acids. Biochem J, 250, 3, 819-25.

Brunkhorst BA, Kraus E, Coppi M, Budnick M, Niederman R, 1992. Propionate induces polymorphonuclear leukocyte activation and inhibits formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated activation. Infect Immun, 60, 7, 2957-68.

Budimirovic DB, Kaufmann WE, 2011. What can we learn about autism from studying fragile X syndrome? Dev Neurosci, 33, 5, 379-94.

Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M, 2016. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. Cell, 165, 7, 1762-75.

Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, Whitaker AH, Atkins D, Bauman ML, Beaudet AL, Carr EG, Gershon MD, Hyman SL, Jirapinyo P, Jyonouchi H, Kooros K, Kushak R, Levitt P, Levy SE, Lewis JD, Murray KF, Natowicz MR, Sabra A, Wershil BK, Weston SC, Zeltzer L, Winter H, 2010. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. Pediatrics, 125 Suppl 1, S1-18.

Burlina AB, Bonafe L, Zacchello F, 1999. Clinical and biochemical approach to the neonate with a suspected inborn error of amino acid and organic acid metabolism. Semin Perinatol, 23, 2, 162-73.

Businaro R, Corsi M, Azzara G, Di Raimo T, Laviola G, Romano E, Ricci L, Maccarrone M, Aronica E, Fuso A, Ricci S, 2016. Interleukin-18 modulation in autism spectrum disorders. J Neuroinflammation, 13, 2.

Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, Elia M, Schneider C, Melmed R, Sacco R, Persico AM, Levitt P, 2006. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 45, 16834-9.

Cappon D, 1953. Clinical manifestations of autism and schizophrenia in childhood. Can Med Assoc J, 69, 1, 44-9.

Careaga M, Van de Water J, Ashwood P, 2010. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. Neurotherapeutics, 7, 3, 283-92.

Carper RA, Courchesne E, 2000. Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. Brain, 123 (Pt 4), 836-44.

Carper RA, Courchesne E, 2005. Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. Biol Psychiatry, 57, 2, 126-33.

Carper RA, Moses P, Tigue ZD, Courchesne E, 2002. Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. Neuroimage, 16, 4, 1038-51.

Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC, 2003. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. Life Sci, 73, 13, 1683-90.

Choi J, Lee S, Won J, Jin Y, Hong Y, Hur TY, Kim JH, Lee SR, Hong Y, 2018. Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. PLoS One, 13, 2, e0192925.

Chomiak T, Hu B, 2013. Alterations of neocortical development and maturation in autism: insight from valproic acid exposure and animal models of autism. Neurotoxicol Teratol, 36, 57-66.

Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M, Lee LC, Pettygrove S, Robinson C, Schulz E, Wells C, Wingate MS, Zahorodny W, Yeargin-Allsopp M, Centers for Disease C, Prevention, 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. MMWR Surveill Summ, 65, 3, 1-23.

Christensen DL, Bilder DA, Zahorodny W, Pettygrove S, Durkin MS, Fitzgerald RT, Rice C, Kurzius-Spencer M, Baio J, Yeargin-Allsopp M, 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among 4-Year-Old Children in the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. J Dev Behav Pediatr, 37, 1, 1-8.

Christensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M, 2013. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. JAMA, 309, 16, 1696-703.

Chugani DC, 2011. alpha-methyl-L-tryptophan: mechanisms for tracer localization of epileptogenic brain regions. Biomark Med, 5, 5, 567-75.

Chugani HT, Da Silva E, Chugani DC, 1996. Infantile spasms: III. Prognostic implications of bitemporal hypometabolism on positron emission tomography. Ann Neurol, 39, 5, 643-9.

Colonna M, Butovsky O, 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol, 35, 441-68.

Cordeiro Q, Vallada H, 2005. Genetics of autism. Braz J Psychiatry, 27, 3, 257.

Coretti L, Cristiano C, Florio E, Scala G, Lama A, Keller S, Cuomo M, Russo R, Pero R, Paciello O, Mattace Raso G, Meli R, Cocozza S, Calignano A, Chiariotti L, Lembo F, 2017. Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. Sci Rep, 7, 45356.

Coury DL, Ashwood P, Fasano A, Fuchs G, Geraghty M, Kaul A, Mawe G, Patterson P, Jones NE, 2012. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. Pediatrics, 130 Suppl 2, S160-8.

Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M, 2002. Activation of the inflammatory response system in autism. Neuropsychobiology, 45, 1, 1-6.

Cuche G, Malbert CH, 1999. Short-chain fatty acids present in the ileum inhibit fasting gastrointestinal motility in conscious pigs. Neurogastroenterol Motil, 11, 3, 219-25.

D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, Cardi E, Giardini O, 1996. Abnormal intestinal permeability in children with autism. Acta Paediatr, 85, 9, 1076-9.

Dawson G, Webb S, Schellenberg GD, Dager S, Friedman S, Aylward E, Richards T, 2002. Defining the broader phenotype of autism: genetic, brain, and behavioral perspectives. Dev Psychopathol, 14, 3, 581-611.

de Almeida LM, Funchal C, Pelaez Pde L, Pessutto FD, Loureiro SO, Vivian L, Wajner M, Pessoa-Pureur R, 2003. Effect of propionic and methylmalonic acids on the in vitro phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during development. Metab Brain Dis, 18, 3, 207-19.

De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobbetti M, 2015. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. Gut Microbes, 6, 3, 207-13.

De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, Cristofori F, Guerzoni ME, Gobbetti M, Francavilla R, 2013. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. PLoS One, 8, 10, e76993.

de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, Carteni M, De Rosa M, Francavilla R, Riegler G, Militerni R, Bravaccio C, 2010. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 51, 4, 418-24.

de Mattos-Dutra A, Meirelles R, Bevilaqua da Rocha B, Kommers T, Wofchuk ST, Wajner M, Pessoa-Pureur R, 2000. Methylmalonic and propionic acids increase the in vitro incorporation of 32P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. Brain Res, 856, 1-2, 111-8.

de Theije CG, Wopereis H, Ramadan M, van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J, Garssen J, Kraneveld AD, Oozeer R, 2014. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. Brain Behav Immun, 37, 197-206.

de Theije CG, Wu J, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Borre Y, Kas MJ, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD, 2014. Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. Behav Brain Res, 261, 265-74.

Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, 2014. Microbiota is essential for social development in the mouse. Mol Psychiatry, 19, 2, 146-8.

DeSoignie R, Sellin JH, 1994. Propionate-initiated changes in intracellular pH in rabbit colonocytes. Gastroenterology, 107, 2, 347-56.

Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year Principal I, Centers for Disease C, Prevention, 2014. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. MMWR Surveill Summ, 63, 2, 1-21.

Dheen ST, Kaur C, Ling EA, 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. Curr Med Chem, 14, 11, 1189-97.

Dietert RR, Dietert JM, Dewitt JC, 2011. Environmental risk factors for autism. Emerg Health Threats J, 4, 7111.

Dinan TG, 2009. Inflammatory markers in depression. Curr Opin Psychiatry, 22, 1, 32-6.

Dover CJ, Le Couteur A, 2007. How to diagnose autism. Arch Dis Child, 92, 6, 540-5.

Drakoularakou A, Tzortzis G, Rastall RA, Gibson GR, 2010. A double-blind, placebo-controlled, randomized human study assessing the capacity of a novel galacto-oligosaccharide mixture in reducing travellers' diarrhoea. Eur J Clin Nutr, 64, 2, 146-52.

Dunne AL, Lloyd C, Lee S, Daffern M, 2020. Associations between the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, alternative model of antisocial personality disorder, psychopathic specifier, and psychopathy-related facets with aggression in a sample of incarcerated males. Personal Disord, 11, 2, 108-18.

Dyck LE, Kazakoff CW, Dourish CT, 1982. The role of catecholamines, 5-hydroxytryptamine and m-tyramine in the behavioural effects of m-tyrosine in the rat. Eur J Pharmacol, 84, 3-4, 139-49.

Edmonson C, Ziats MN, Rennert OM, 2014. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. Mol Autism, 5, 1, 3.

El-Ansary AK, Al-Daihan SK, El-Gezeery AR, 2011. On the protective effect of omega-3 against propionic acid-induced neurotoxicity in rat pups. Lipids Health Dis, 10, 142.

Engelhardt B, 2003. Development of the blood-brain barrier. Cell Tissue Res, 314, 1, 119-29.

Enstrom A, Krakowiak P, Onore C, Pessah IN, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Van de Water JA, Ashwood P, 2009. Increased IgG4 levels in children with autism disorder. Brain Behav Immun, 23, 3, 389-95.

Fazlioglu Y, Baran G, 2008. A sensory integration therapy program on sensory problems for children with autism. Percept Mot Skills, 106, 2, 415-22.

Fernandez de Cossio L, Guzman A, van der Veldt S, Luheshi GN, 2017. Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. Brain Behav Immun, 63, 88-98.

Ferreira CE, Nakano V, Durigon EL, Avila-Campos MJ, 2003. Prevalence of Clostridium spp. and Clostridium difficile in children with acute diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 98, 4, 451-4.

Filiano AJ, Xu Y, Tustison NJ, Marsh RL, Baker W, Smirnov I, Overall CC, Gadani SP, Turner SD, Weng Z, Peerzade SN, Chen H, Lee KS, Scott MM, Beenhakker MP, Litvak V, Kipnis J, 2016. Unexpected role of interferon-gamma in regulating neuronal connectivity and social behaviour. Nature, 535, 7612, 425-9.

Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA, 3rd, 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. Anaerobe, 16, 4, 444-53.

Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, McTeague M, Sandler R, Wexler H, Marlowe EM, Collins MD, Lawson PA, Summanen P, Baysallar M, Tomzynski TJ, Read E, Johnson E, Rolfe R, Nasir P, Shah H, Haake DA, Manning P, Kaul A, 2002. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. Clin Infect Dis, 35, Suppl 1, S6-S16.

Foley KA, MacFabe DF, Vaz A, Ossenkopp KP, Kavaliers M, 2014. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. Int J Dev Neurosci, 39, 68-78.

Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, Macfabe DF, 2014. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. PLoS One, 9, 1, e87072.

Folstein SE, Rosen-Sheidley B, 2001. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. Nat Rev Genet, 2, 12, 943-55.

Fombonne E, 2009. Epidemiology of pervasive developmental disorders. Pediatr Res, 65, 6, 591-8.

Fox E, Amaral D, Van de Water J, 2012. Maternal and fetal antibrain antibodies in development and disease. Dev Neurobiol, 72, 10, 1327-34.

Freitag CM, 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. Mol Psychiatry, 12, 1, 2-22.

Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E, Waltes R, 2010. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. Eur Child Adolesc Psychiatry, 19, 3, 169-78.

Frye RE, Rose S, Slattery J, MacFabe DF, 2015. Gastrointestinal dysfunction in autism spectrum disorder: the role of the mitochondria and the enteric microbiome. Microb Ecol Health Dis, 26, 27458.

Fujita K, Nakanishi K, Sobue K, Ueki T, Asai K, Kato T, 1998. Astrocytic gap junction blockage and neuronal Ca2+ oscillation in neuron-astrocyte cocultures in vitro. Neurochem Int, 33, 1, 41-9.

Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC, 2003. Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. J Neuropathol Exp Neurol, 62, 3, 304-14.

Gabriele S, Sacco R, Altieri L, Neri C, Urbani A, Bravaccio C, Riccio MP, Iovene MR, Bombace F, De Magistris L, Persico AM, 2016. Slow intestinal transit contributes to elevate urinary p-cresol level in Italian autistic children. Autism Res, 9, 7, 752-9.

Gabriele S, Sacco R, Cerullo S, Neri C, Urbani A, Tripi G, Malvy J, Barthelemy C, Bonnet-Brihault F, Persico AM, 2014. Urinary p-cresol is elevated in young French children with autism spectrum disorder: a replication study. Biomarkers, 19, 6, 463-70.

Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J, 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. J Immunol, 189, 9, 4213-9.

Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J, 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. Mol Neurobiol, 48, 3, 690-701.

Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH, 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. Lancet, 355, 9216, 1680-3.

Gillberg C, Billstedt E, 2000. Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. Acta Psychiatr Scand, 102, 5, 321-30.

Giovannini M, Agostoni C, Salari PC, 1991. The role of lipids in nutrition during the first months of life. J Int Med Res, 19, 5, 351-62.

Goffredo M, Mass K, Parks EJ, Wagner DA, McClure EA, Graf J, Savoye M, Pierpont B, Cline G, Santoro N, 2016. Role of Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids in Modulating Energy Harvest and Fat Partitioning in Youth. J Clin Endocrinol Metab, 101, 11, 4367-76.

Goines P, Haapanen L, Boyce R, Duncanson P, Braunschweig D, Delwiche L, Hansen R, Hertz-Picciotto I, Ashwood P, Van de Water J, 2011. Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behavior. Brain Behav Immun, 25, 3, 514-23.

Grigorenko EL, Han SS, Yrigollen CM, Leng L, Mizue Y, Anderson GM, Mulder EJ, de Bildt A, Minderaa RB, Volkmar FR, Chang JT, Bucala R, 2008. Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. Pediatrics, 122, 2, e438-45.

Gupta S, Caskey A, Soares N, Augustyn M, 2018. Autism Spectrum Disorder and Mental Health Comorbidity Leading to Prolonged Inpatient Admission. J Dev Behav Pediatr, 39, 6, 523-5.

Hampson DR, Gholizadeh S, Pacey LK, 2012. Pathways to drug development for autism spectrum disorders. Clin Pharmacol Ther, 91, 2, 189-200.

Hanisch UK, Kettenmann H, 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci, 10, 11, 1387-94.

Hasselbalch SG, Knudsen GM, Capaldo B, Postiglione A, Paulson OB, 2001. Blood-brain barrier transport and brain metabolism of glucose during acute hyperglycemia in humans. J Clin Endocrinol Metab, 86, 5, 1986-90.

Haznedar MM, Buchsbaum MS, Metzger M, Solimando A, Spiegel-Cohen J, Hollander E, 1997. Anterior cingulate gyrus volume and glucose metabolism in autistic disorder. Am J Psychiatry, 154, 8, 1047-50.

Heberling CA, Dhurjati PS, Sasser M, 2013. Hypothesis for a systems connectivity model of Autism Spectrum Disorder pathogenesis: links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. Med Hypotheses, 80, 3, 264-70.

Heo Y, Zhang Y, Gao D, Miller VM, Lawrence DA, 2011. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. PLoS One, 6, 7, e20912.

Heuer L, Ashwood P, Schauer J, Goines P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Croen LA, Pessah IN, Van de Water J, 2008. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. Autism Res, 1, 5, 275-83.

Holt R, Monaco AP, 2011. Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. EMBO Mol Med, 3, 8, 438-50.

Holzel BK, Ott U, Hempel H, Hackl A, Wolf K, Stark R, Vaitl D, 2007. Differential engagement of anterior cingulate and adjacent medial frontal cortex in adept meditators and non-meditators. Neurosci Lett, 421, 1, 16-21.

Horvath K, Papadimitriou JC, Rabsztyn A, Drachenberg C, Tildon JT, 1999. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. J Pediatr, 135, 5, 559-63.

Hsiao EY, McBride SW, Chow J, Mazmanian SK, Patterson PH, 2012. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 109, 31, 12776-81.

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK, 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. Cell, 155, 7, 1451-63.

Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP, 2001. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 280, 3, H1241-8.

Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM, 2000. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. Neurotoxicol Teratol, 22, 3, 319-24.

Jack A, K AP, 2017. Annual Research Review: Understudied populations within the autism spectrum - current trends and future directions in neuroimaging research. J Child Psychol Psychiatry, 58, 4, 411-35.

Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Metivier D, Kroemer G, Brenner C, 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. Cell Death Differ, 9, 2, 179-88.

Jones CA, Holloway JA, Warner JO, 2000. Does atopic disease start in foetal life? Allergy, 55, 1, 2-10.

Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Zimmerman-Bier B, 2005. Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. Neuropsychobiology, 51, 2, 77-85.

Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N, 2002. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. Neuropsychobiology, 46, 2, 76-84.

Kajizuka M, Miyachi T, Matsuzaki H, Iwata K, Shinmura C, Suzuki K, Suda S, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Takei N, Mori N, 2010. Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 34, 1, 154-8.

Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R, 2019. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. Sci Rep, 9, 1, 5821.

Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, Pollard EL, Roux S, Sadowsky MJ, Lipson KS, Sullivan MB, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R, 2017. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. Microbiome, 5, 1, 10.

Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R, 2013. Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. PLoS One, 8, 7, e68322.

Kanner L, 1968. Autistic disturbances of affective contact. Acta Paedopsychiatr, 35, 4, 100-36.

Kanner L, 1968. Early infantile autism revisited. Psychiatry Dig, 29, 2, 17-28.

Karuri AR, Dobrowsky E, Tannock IF, 1993. Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. Br J Cancer, 68, 6, 1080-7.

Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I, 2015. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. Nutrients, 7, 4, 2839-49.

Kemper TL, Bauman M, 1998. Neuropathology of infantile autism. J Neuropathol Exp Neurol, 57, 7, 645-52.

Kemper TL, Bauman ML, 1993. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. Neurol Clin, 11, 1, 175-87.

Kemper TL, Bauman ML, 2002. Neuropathology of infantile autism. Mol Psychiatry, 7 Suppl 2, S12-3.

Kielian T, Esen N, 2004. Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. Neurochem Int, 45, 2-3, 429-36.

Kierdorf K, Prinz M, 2013. Factors regulating microglia activation. Front Cell Neurosci, 7, 44.

Kilpinen H, Ylisaukko-Oja T, Hennah W, Palo OM, Varilo T, Vanhala R, Nieminen-von Wendt T, von Wendt L, Paunio T, Peltonen L, 2008. Association of DISC1 with autism and Asperger syndrome. Mol Psychiatry, 13, 2, 187-96.

Kinney DK, Barch DH, Chayka B, Napoleon S, Munir KM, 2010. Environmental risk factors for autism: do they help cause de novo genetic mutations that contribute to the disorder? Med Hypotheses, 74, 1, 102-6.

Kirsten TB, Bernardi MM, 2017. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. Behav Brain Res, 331, 25-9.

Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F, 2016. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. Cell, 165, 6, 1332-45.

Kohane IS, McMurry A, Weber G, MacFadden D, Rappaport L, Kunkel L, Bickel J, Wattanasin N, Spence S, Murphy S, Churchill S, 2012. The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. PLoS One, 7, 4, e33224.

Koj A, 1985. Cytokines regulating acute inflammation and synthesis of acute phase proteins. Blut, 51, 4, 267-74.

Kreutzberg GW, 1995. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. Arzneimittelforschung, 45, 3A, 357-60.

Kreutzberg GW, 1996. Principles of neuronal regeneration. Acta Neurochir Suppl, 66, 103-6.

Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER, 1985. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 82, 4, 1204-8.

Laurence JA, Fatemi SH, 2005. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. Cerebellum, 4, 3, 206-10.

Lauritsen MB, Pedersen CB, Mortensen PB, 2005. Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study. J Child Psychol Psychiatry, 46, 9, 963-71.

Lawler CP, Croen LA, Grether JK, Van de Water J, 2004. Identifying environmental contributions to autism: provocative clues and false leads. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 10, 4, 292-302.

Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M, 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem, 278, 28, 25481-9.

LeBeau FE, Traub RD, Monyer H, Whittington MA, Buhl EH, 2003. The role of electrical signaling via gap junctions in the generation of fast network oscillations. Brain Res Bull, 62, 1, 3-13.

Lenz KM, Nelson LH, 2018. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. Front Immunol, 9, 698.

Li J, Tabor HK, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich LJ, Spiker D, Risch N, Myers RM, 2002. Lack of association between HoxA1 and HoxB1 gene variants and autism in 110 multiplex families. Am J Med Genet, 114, 1, 24-30.

Li JY, Boado RJ, Pardridge WM, 2001. Blood-brain barrier genomics. J Cereb Blood Flow Metab, 21, 1, 61-8.

Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ, 2017. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. Front Cell Neurosci, 11, 120.

Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, Ji L, Brown T, Malik M, 2009. Elevated immune response in the brain of autistic patients. J Neuroimmunol, 207, 1-2, 111-6.

Liang J, Takeuchi H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Jin S, Yawata I, Li H, Yasuoka S, Mizuno T, Suzumura A, 2008. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. Brain Res, 1210, 11-9.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA, 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature, 541, 7638, 481-7.

Liu J, Nyholt DR, Magnussen P, Parano E, Pavone P, Geschwind D, Lord C, Iversen P, Hoh J, Ott J, Gilliam TC, Autism Genetic Resource Exchange C, 2001. A genomewide screen for autism susceptibility loci. Am J Hum Genet, 69, 2, 327-40.

Liu Z, Li N, Neu J, 2005. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. Acta Paediatr, 94, 4, 386-93.

Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J, 2018. Autism spectrum disorder. Lancet, 392, 10146, 508-20.

Lucchina L, Depino AM, 2014. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. Autism Res, 7, 2, 273-89.

Luna LG, 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.

Ma D, Salyakina D, Jaworski JM, Konidari I, Whitehead PL, Andersen AN, Hoffman JD, Slifer SH, Hedges DJ, Cukier HN, Griswold AJ, McCauley JL, Beecham GW, Wright HH, Abramson RK, Martin ER, Hussman JP, Gilbert JR, Cuccaro ML, Haines JL, Pericak-Vance MA, 2009. A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. Ann Hum Genet, 73, Pt 3, 263-73.

Macfabe DF, 2012. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. Microb Ecol Health Dis, 23.

MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boon F, Taylor AR, Kavaliers M, Ossenkopp KP, 2007. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. Behav Brain Res, 176, 1, 149-69.

MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP, 2011. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. Behav Brain Res, 217, 1, 47-54.

Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, Cook EH, Weeks DE, Monaco AP, 1999. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. Am J Med Genet, 88, 5, 492-6.

Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH, 2012. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. Brain Behav Immun, 26, 4, 607-16.

Marcaggi P, Attwell D, 2004. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. Glia, 47, 3, 217-25.

Martin ER, Menold MM, Wolpert CM, Bass MP, Donnelly SL, Ravan SA, Zimmerman A, Gilbert JR, Vance JM, Maddox LO, Wright HH, Abramson RK, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, 2000. Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. Am J Med Genet, 96, 1, 43-8.

Matta SM, Hill-Yardin EL, Crack PJ, 2019. The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. Brain Behav Immun, 79, 75-90.

Matthay MA, 2001. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. N Engl J Med, 344, 10, 759-62.

Maurer MH, Canis M, Kuschinsky W, Duelli R, 2004. Correlation between local monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and glucose transporter 1 (GLUT1) densities in the adult rat brain. Neurosci Lett, 355, 1-2, 105-8.

Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT, 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature, 489, 7415, 231-41.

Mazur-Kolecka B, Cohen IL, Gonzalez M, Jenkins EC, Kaczmarski W, Brown WT, Flory M, Frackowiak J, 2014. Autoantibodies against neuronal progenitors in sera from children with autism. Brain Dev, 36, 4, 322-9.

McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N Engl J Med, 353, 23, 2433-41.

McManus CM, Michel KE, Simon DM, Washabau RJ, 2002. Effect of short-chain fatty acids on contraction of smooth muscle in the canine colon. Am J Vet Res, 63, 2, 295-300.

Meyer U, 2011. Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. Brain Behav Immun, 25, 8, 1507-18.

Miles JH, 2011. Autism spectrum disorders--a genetics review. Genet Med, 13, 4, 278-94.

Minshew NJ, Williams DL, 2007. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. Arch Neurol, 64, 7, 945-50.

Mitsui R, Ono S, Karaki S, Kuwahara A, 2005. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. Neurogastroenterol Motil, 17, 4, 585-94.

Molloy CA, Manning-Courtney P, 2003. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. Autism, 7, 2, 165-71.

Moore H, Grace AA, 2002. A role for electrotonic coupling in the striatum in the expression of dopamine receptor-mediated stereotypies. Neuropsychopharmacology, 27, 6, 980-92.

Morgan JT, Chana G, Abramson I, Semendeferi K, Courchesne E, Everall IP, 2012. Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. Brain Res, 1456, 72-81.

Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, Courchesne E, Everall IP, 2010. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. Biol Psychiatry, 68, 4, 368-76.

Mortensen FV, Nielsen H, Mulvany MJ, Hessov I, 1990. Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. Gut, 31, 12, 1391-4.

Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, Barbaro JR, Wilson LM, Threadgill DW, Lauder JM, Magnuson TR, Crawley JN, 2007. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. Behav Brain Res, 176, 1, 4-20.

Muller RA, Cauich C, Rubio MA, Mizuno A, Courchesne E, 2004. Abnormal activity patterns in premotor cortex during sequence learning in autistic patients. Biol Psychiatry, 56, 5, 323-32.

Nagy E, Loveland KA, 2002. Prolonged brainstem auditory evoked potentials: an autism-specific or autism-nonspecific marker. Arch Gen Psychiatry, 59, 3, 288-90.

Nakao S, Fujii A, Niederman R, 1992. Alteration of cytoplasmic Ca2+ in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. Infect Immun, 60, 12, 5307-11.

Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, La Gamma EF, 2014. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells--possible relevance to autism spectrum disorders. PLoS One, 9, 8, e103740.

Napoli I, Neumann H, 2009. Microglial clearance function in health and disease. Neuroscience, 158, 3, 1030-8.

Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N, 2002. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. Pediatr Res, 52, 4, 576-9.

Naviaux RK, Curtis B, Li K, Naviaux JC, Bright AT, Reiner GE, Westerfield M, Goh S, Alaynick WA, Wang L, Capparelli EV, Adams C, Sun J, Jain S, He F, Arellano DA, Mash LE, Chukoskie L, Lincoln A, Townsend J, 2017. Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. Annals of Clinical and Translational Neurology, 4, 7, 491-505.

Needham BD, Tang W, Wu WL, 2018. Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder. Dev Neurobiol, 78, 5, 474-99.

Nicot A, Otto T, Brabet P, Dicicco-Bloom EM, 2004. Altered social behavior in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. J Neurosci, 24, 40, 8786-95.

Nikolov RN, Bearss KE, Lettinga J, Erickson C, Rodowski M, Aman MG, McCracken JT, McDougle CJ, Tierney E, Vitiello B, Arnold LE, Shah B, Posey DJ, Ritz L, Scahill L, 2009.

Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. J Autism Dev Disord, 39, 3, 405-13.

Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R, 1995. Cytokines and growth factors in renal disease. Nephrol Dial Transplant, 10, 6, 775-86.

Nudel R, Simpson NH, Baird G, O'Hare A, Conti-Ramsden G, Bolton PF, Hennessy ER, Consortium SLI, Monaco AP, Knight JC, Winney B, Fisher SE, Newbury DF, 2014. Associations of HLA alleles with specific language impairment. J Neurodev Disord, 6, 1, 1.

O'Donnell P, Grace AA, 1997. Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. Neuroscience, 76, 1, 1-5.

O'Donnell P, Greene J, Pabello N, Lewis BL, Grace AA, 1999. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. Ann N Y Acad Sci, 877, 157-75.

O'Hara AM, Shanahan F, 2006. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep, 7, 7, 688-93.

O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF, 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Behav Brain Res, 277, 32-48.

O'Reilly SA, Roedica J, Nagy D, Hallewell RA, Alderson K, Marklund SL, Kuby J, Kushner PD, 1995. Motor neuron-astrocyte interactions and levels of Cu,Zn superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol, 131, 2, 203-10.

Odell D, Maciulis A, Cutler A, Warren L, McMahon WM, Coon H, Stubbs G, Henley K, Torres A, 2005. Confirmation of the association of the C4B null allelle in autism. Hum Immunol, 66, 2, 140-5.

Odom SL, Boyd BA, Hall LJ, Hume K, 2010. Evaluation of comprehensive treatment models for individuals with autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord, 40, 4, 425-36.

Ohshima H, Nair J, Bourgade MC, Friesen M, Garren L, Bartsch H, 1985. Identification and occurrence of two new N-nitrosamino acids in tobacco products: 3-(N-nitroso-N-methylamino)propionic acid and 4-(N-nitroso-N-methylamino)butyric acid. Cancer Lett, 26, 2, 153-62.

Ojo ES, Ishola IO, Ben-Azu B, Afolayan OO, James AB, Ajayi AM, Umukoro S, Adeyemi OO, 2019. Ameliorative influence of Cnestis ferruginea vahl ex DC (Connaraceae) root extract on kainic acid-induced temporal lobe epilepsy in mice: Role of oxidative stress and neuroinflammation. J Ethnopharmacol, 243, 112117.

Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suda S, Suzuki K, Sugihara G, Matsuzaki H, Sugiyama T, Kawai M, Minabe Y, Takei N, Mori N, 2007. Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 31, 1, 187-90.

Ong WY, Farooqui T, Farooqui AA, 2010. Involvement of cytosolic phospholipase A(2), calcium independent phospholipase A(2) and plasmalogen selective phospholipase A(2) in neurodegenerative and neuropsychiatric conditions. Curr Med Chem, 17, 25, 2746-63.

Onore C, Careaga M, Ashwood P, 2012. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. Brain Behav Immun, 26, 3, 383-92.

Onore CE, Nordahl CW, Young GS, Van de Water JA, Rogers SJ, Ashwood P, 2012. Levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and P-selectin are decreased in children with autism spectrum disorder. Biol Psychiatry, 72, 12, 1020-5.

Orsmond GI, Seltzer MM, 2007. Siblings of individuals with autism or Down syndrome: effects on adult lives. J Intellect Disabil Res, 51, Pt 9, 682-96.

Pacey LK, Guan S, Tharmalingam S, Thomsen C, Hampson DR, 2015. Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum. Brain Behav, 5, 10, e00400.

Palomo T, Beninger RJ, Kostrzewa RM, Archer T, 2003. Brain sites of movement disorder: genetic and environmental agents in neurodevelopmental perturbations. Neurotox Res, 5, 1-2, 1-26.

Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW, 2005. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. Int Rev Psychiatry, 17, 6, 485-95.

Parker-Athill E, Luo D, Bailey A, Giunta B, Tian J, Shytle RD, Murphy T, Legradi G, Tan J, 2009. Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. J Neuroimmunol, 217, 1-2, 20-7.

Peinado A, Yuste R, Katz LC, 1993. Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. Neuron, 10, 1, 103-14.

Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M, 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neurosci Lett, 565, 30-8.

Penn HE, 2006. Neurobiological correlates of autism: a review of recent research. Child Neuropsychol, 12, 1, 57-79.

Perea G, Navarrete M, Araque A, 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci, 32, 8, 421-31.

Perez-Velazquez JL, Valiante TA, Carlen PL, 1994. Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. J Neurosci, 14, 7, 4308-17.

Perez Velazquez JL, Frantseva MV, Naus CC, 2003. Gap junctions and neuronal injury: protectants or executioners? Neuroscientist, 9, 1, 5-9.

Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, Wassink TH, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo M, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Conciatori M, Marino R, Quattrocchi CC, Baldi A, Zelante L, Gasparini P, Keller F, Collaborative Linkage Study of A, 2001. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. Mol Psychiatry, 6, 2, 150-9.

Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC, 2015. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. Clin Ther, 37, 5, 984-95.

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Igliozzi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahon WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Pilorge M, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI, Jr., Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C, 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. Nature, 466, 7304, 368-72.

Plioplys AV, Hemmens SE, Regan CM, 1990. Expression of a neural cell adhesion molecule serum fragment is depressed in autism. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2, 4, 413-7.

Poletti S, Leone G, Hoogenboezem TA, Ghiglino D, Vai B, de Wit H, Wijkhuijs AJM, Locatelli C, Colombo C, Drexhage HA, Benedetti F, 2019. Markers of neuroinflammation influence measures of cortical thickness in bipolar depression. Psychiatry Res Neuroimaging, 285, 64-6.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT, 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Glia, 55, 5, 453-62.

Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP, Bergersen L, 2003. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. Neuroscience, 122, 3, 677-88.

Raison CL, Borisov AS, Majer M, Drake DF, Pagnoni G, Woolwine BJ, Vogt GJ, Massung B, Miller AH, 2009. Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. Biol Psychiatry, 65, 4, 296-303.

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM, 2016. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. Front Hum Neurosci, 10, 566.

Reichow B, Hume K, Barton EE, Boyd BA, 2018. Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). Cochrane Database Syst Rev, 5, CD009260.

Reuss B, Unsicker K, 1998. Regulation of gap junction communication by growth factors from non-neural cells to astroglia: a brief review. Glia, 24, 1, 32-8.

Roche AF, Siervogel RM, 1991. Measures of body composition. Their relationship to blood pressure and use in epidemiologic research. Ann Epidemiol, 1, 4, 313-9.

Rorig B, Klausa G, Sutor B, 1995. Dye coupling between pyramidal neurons in developing rat prefrontal and frontal cortex is reduced by protein kinase A activation and dopamine. J Neurosci, 15, 11, 7386-400.

Rorig B, Klausa G, Sutor B, 1996. Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones. J Physiol, 490 (Pt 1), 31-49.

Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, Nelson MN, Wexler HM, 2000. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. J Child Neurol, 15, 7, 429-35.

Schneider C, 2005. Chemistry and biology of vitamin E. Mol Nutr Food Res, 49, 1, 7-30.

Schorderet M, Nowak JZ, 1990. Retinal dopamine D1 and D2 receptors: characterization by binding or pharmacological studies and physiological functions. Cell Mol Neurobiol, 10, 3, 303-25.

Schwartz M, Kipnis J, 2011. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. Brain Behav Immun, 25, 5, 817-9.

Shams S, Foley KA, Kavaliers M, MacFabe DF, Ossenkopp KP, 2019. Systemic treatment with the enteric bacterial metabolic product propionic acid results in reduction of social behavior in juvenile rats: Contribution to a rodent model of autism spectrum disorder. Dev Psychobiol, 61, 5, 688-99.

Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, Zink EM, Casey CP, Taylor BC, Lane CJ, Bramer LM, Isern NG, Hoyt DW, Noecker C, Sweredoski MJ, Moradian A, Borenstein E, Jansson JK, Knight R, Metz TO, Lois C, Geschwind DH, Krajmalnik-Brown R, Mazmanian SK, 2019. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. Cell, 177, 6, 1600-18 e17.

Shaw W, 2010. Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPHPA), an abnormal phenylalanine metabolite of Clostridia spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia. Nutr Neurosci, 13, 3, 135-43.

Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S, 2017. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. Cell Rep, 19, 6, 1151-64.

Shultz SR, Macfabe DF, Martin S, Jackson J, Taylor R, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP, 2009. Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and sensorimotor ability in the Long-Evans rat: further development of a rodent model of autism. Behav Brain Res, 200, 1, 33-41.

Shultz SR, MacFabe DF, Ossenkopp KP, Scratch S, Whelan J, Taylor R, Cain DP, 2008. Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. Neuropharmacology, 54, 6, 901-11.

Siflinger-Birnboim A, Malik AB, 1996. Regulation of endothelial permeability by second messengers. New Horiz, 4, 1, 87-98.

Siniscalco D, Mijatovic T, Bosmans E, Cirillo A, Kruzliak P, Lombardi VC, De Meirleir K, Antonucci N, 2016. Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. In Vivo, 30, 2, 83-9.

Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH, 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. J Neurosci, 27, 40, 10695-702.

Sofroniew MV, Vinters HV, 2010. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol, 119, 1, 7-35.

Song Y, Liu C, Finegold SM, 2004. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. Appl Environ Microbiol, 70, 11, 6459-65.

Sparks BF, Friedman SD, Shaw DW, Aylward EH, Echelard D, Artru AA, Maravilla KR, Giedd JN, Munson J, Dawson G, Dager SR, 2002. Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. Neurology, 59, 2, 184-92.

Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O, Hippe H, 1997. Phylogenetic analysis of the genus Desulfotomaculum: evidence for the misclassification of Desulfotomaculum guttoideum and description of Desulfotomaculum orientis as Desulfosporosinus orientis gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol, 47, 4, 1134-9.

Stanfield AC, McIntosh AM, Spencer MD, Philip R, Gaur S, Lawrie SM, 2008. Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. Eur Psychiatry, 23, 4, 289-99.

Stolp HB, Liddelow SA, Sa-Pereira I, Dziegielewska KM, Saunders NR, 2013. Immune responses at brain barriers and implications for brain development and neurological function in later life. Front Integr Neurosci, 7, 61.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y, 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. J Physiol, 558, Pt 1, 263-75.

Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kameno Y, Shimmura C, Kawai S, Yoshihara Y, Wakuda T, Takebayashi K, Takagai S, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N, 2011. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. PLoS One, 6, 5, e20470.

Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuj M, Tabouy T, Lukic I, Maayouf R, Werbner N, Ben-Amram H, Nuriel-Ohayon M, Koren O, Elliott E, 2018. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. Brain Behav Immun, 73, 310-9.

Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Sai Y, Ogihara T, Higashida H, Tsuji A, 1995. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. Biochem Biophys Res Commun, 214, 2, 482-9.

Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A, 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J Physiol Pharmacol, 59 Suppl 2, 251-62.

Tetreault NA, Hakeem AY, Jiang S, Williams BA, Allman E, Wold BJ, Allman JM, 2012. Microglia in the cerebral cortex in autism. J Autism Dev Disord, 42, 12, 2569-84.

Thomas RH, Meeking MM, Mepham JR, Tichenoff L, Possmayer F, Liu S, MacFabe DF, 2012. The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. J Neuroinflammation, 9, 153.

van de Veerdonk FL, Netea MG, 2013. New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. Front Immunol, 4, 167.

Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA, 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Ann Neurol, 57, 1, 67-81.

Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR, 2017. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. Acta Neuropathol, 134, 4, 537-66.

Vats P, Juneja M, Mishra D, 2018. Diagnostic Accuracy of International Epidemiology Network (INCLEN) Diagnostic Tool for Autism Spectrum Disorder (INDT-ASD) in Comparison with Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5 (DSM-5). Indian Pediatr, 55, 6, 482-4.

Velazquez JL, Han D, Carlen PL, 1997. Neurotransmitter modulation of gap junctional communication in the rat hippocampus. Eur J Neurosci, 9, 12, 2522-31.

Vilhardt F, 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. Int J Biochem Cell Biol, 37, 1, 17-21.

Virelizier JL, 1985. Interferons as cytokines regulating leukocyte functions in vivo. Ann Inst Pasteur Immunol (1985), 136D, 1, 73-7.

Wahlsten D, Metten P, Crabbe JC, 2003. Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T/+ tf/tf has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum. Brain Res, 971, 1, 47-54.

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS, 2004. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. J Inherit Metab Dis, 27, 4, 427-48.

Waltereit R, Welzl H, Dichgans J, Lipp HP, Schmidt WJ, Weller M, 2006. Enhanced episodic-like memory and kindling epilepsy in a rat model of tuberous sclerosis. J Neurochem, 96, 2, 407-13.

Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M, 2014. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. Lancet Infect Dis, 14, 11, 1150-62.

Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA, 2012. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. Dig Dis Sci, 57, 8, 2096-102.

Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA, 2013. Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with autism spectrum disorder. Mol Autism, 4, 1, 42.

Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G, 2002. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. World J Gastroenterol, 8, 3, 540-5.

Warren RP, Odell JD, Warren WL, Burger RA, Maciulis A, Daniels WW, Torres AR, 1996. Strong association of the third hypervariable region of HLA-DR beta 1 with autism. J Neuroimmunol, 67, 2, 97-102.

Warren RP, Singh VK, Averett RE, Odell JD, Maciulis A, Burger RA, Daniels WW, Warren WL, 1996. Immunogenetic studies in autism and related disorders. Mol Chem Neuropathol, 28, 1-3, 77-81.

Wassink TH, Brzustowicz LM, Bartlett CW, Szatmari P, 2004. The search for autism disease genes. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 10, 4, 272-83.

Watts G, 2007. Animal testing: is it worth it? BMJ, 334, 7586, 182-4.

Wei H, Alberts I, Li X, 2013. Brain IL-6 and autism. Neuroscience, 252, 320-5.

Weiss LA, Arking DE, Gene Discovery Project of Johns H, the Autism C, Daly MJ, Chakravarti A, 2009. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. Nature, 461, 7265, 802-8.

White JF, 2003. Intestinal pathophysiology in autism. Exp Biol Med (Maywood), 228, 6, 639-49.

Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI, 2012. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. mBio, 3, 1.

Wing L, Gould J, 1979. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. J Autism Dev Disord, 9, 1, 11-29.

Woodbury-Smith M, Nicolson R, Zarrei M, Yuen RKC, Walker S, Howe J, Uddin M, Hoang N, Buchanan JA, Chrysler C, Thompson A, Szatmari P, Scherer SW, 2017. Variable phenotype expression in a family segregating microdeletions of the NRXN1 and MBD5 autism spectrum disorder susceptibility genes. NPJ Genom Med, 2.

Wostmann BS, 1981. The germfree animal in nutritional studies. Annu Rev Nutr, 1, 257-79.

Wyse AT, Brusque AM, Silva CG, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CM, 1998. Inhibition of Na+,K+-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. Neuroreport, 9, 8, 1719-21.

Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T, 2003. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. J Autism Dev Disord, 33, 4, 455-9.

Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, Aizawa H, Yamawaki S, Kanematsu T, Akagi H, 2018. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. Brain Res, 1680, 13-38.

Yang SY, Cho SC, Yoo HJ, Cho IH, Park M, Kim BN, Kim JW, Shin MS, Park TW, Son JW, Chung US, Kim HW, Yang YH, Kang JO, Kim SA, 2010. Association study between single nucleotide polymorphisms in promoter region of AVPR1A and Korean autism spectrum disorders. Neurosci Lett, 479, 3, 197-200.

Yarandi SS, Peterson DA, Treisman GJ, Moran TH, Pasricha PJ, 2016. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. J Neurogastroenterol Motil, 22, 2, 201-12.

Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, Ebstein RP, 2001. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. Am J Med Genet, 105, 4, 381-6.

Ylisaukko-oja T, Nieminen-von Wendt T, Kempas E, Sarenius S, Varilo T, von Wendt L, Peltonen L, Jarvela I, 2004. Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome. Mol Psychiatry, 9, 2, 161-8.

Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS, 2010. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? Mol Neurobiol, 41, 2-3, 232-41.

Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, Rosenfield R, 2005. What is the pathogenesis of acne? Exp Dermatol, 14, 2, 143-52.

EK-B:Turnitin Raporu

PROPİYONİK ASİT İLE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN RAT OTİZM MODELİNDE MİKROGLİA AKTİVASYONU, NÖROENFLAMASYON VE NÖRONAL KAYIP VARLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye BAŞER Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Gönderim Tarihi: 11-Kas-2020 03:44AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1442444547
Dosya adı: S_meyye_BA_ER_TEZ_1.docx (1.51M)
Kelime sayısı: 24843
Karakter sayısı: 157747

PROPİYONİK ASİT İLE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN RAT OTİZM MODELİNDE MİKROGLİA AKTİVASYONU, NÖROENFLAMASYON VE NÖRONAL KAYIP VARLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%11	%11	%3	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	www.turkpsikiyatri.com İnternet Kaynağı	%5
2	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.tavsiyeediyorum.com İnternet Kaynağı	<%1
6	docs.wixstatic.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.msxlabs.org İnternet Kaynağı	<%1
8	beslenmevediyetdergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
9	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

10	www.ozelegitim.psikolojikdanisma.net İnternet Kaynağı	<%1
11	DOKUTAN, Şule, DOLU, Nazan and SARICA, Zeynep, Soyer. "Genç erkek sıçanlarda E vitamini uygulamasının yer bulma öğrenmesine etkisi", Fırat Üniversitesi, 2007. Yayın	<%1
12	openaccess.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
13	klimikdergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
14	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
15	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
16	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1
17	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
18	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1
19	Gül Eda KILINÇ, Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT. "A Current Approach to Microbiota: Autism and Microbiota", Turkiye Klinikleri Journal of Health	<%1

Sciences, 2018
Yayın

20	acikerisim.munzur.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
21	muratvuranlar.com İnternet Kaynağı	<%1
22	sbk2019.org İnternet Kaynağı	<%1
23	kpearg.com İnternet Kaynağı	<%1
24	es.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
25	www.psikofarmakoloji.org İnternet Kaynağı	<%1
26	research.nsu.ru İnternet Kaynağı	<%1
27	www.ices-uebk.org İnternet Kaynağı	<%1
28	docplayer.nl İnternet Kaynağı	<%1
29	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
30	e-dergi.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

31	repozitorij.svkst.unist.hr İnternet Kaynağı	<%1
32	pt.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
33	webadmin.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
34	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<%1
35	www.jpedres.org İnternet Kaynağı	<%1
36	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
37	ceadder.org İnternet Kaynağı	<%1
38	halksagligiokulu.org İnternet Kaynağı	<%1
39	www.ejmanager.com İnternet Kaynağı	<%1
40	www.natural2019.com İnternet Kaynağı	<%1
41	TEKCE, Emre and GÜL, Mehmet. "Ruminant Beslemede NDF ve ADF nin Önemi", Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2014. Yayın	<%1

42	tanawisa.com İnternet Kaynağı	<%1
43	www.bitkibilimi.net İnternet Kaynağı	<%1
44	eresources.uin-malang.ac.id İnternet Kaynağı	<%1
45	sunaalbayrak.info.tr İnternet Kaynağı	<%1
46	oro.open.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
47	www.esp.org İnternet Kaynağı	<%1
48	jneuroinflammation.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<%1
49	Sheryl S. Moy, Jessica J. Nadler, Terry R. Magnuson, Jacqueline N. Crawley. "Mouse models of autism spectrum disorders: The challenge for behavioral genetics", American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2006 Yayın	<%1
50	VARMA SÖZERİ, Gülfizar. "Major depresif bozuklukta nöroinflamatuvar hipotez", Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 2014. Yayın	<%1

51	ŞENER, Elif Funda and ÖZKUL, Yusuf. "Otizmin genetik temellleri", Fırat Üniversitesi, 2013. Yayın	<%1
52	N. A. Halsey, S. L. Hyman, the Conference Writing Panel. "Measles-Mumps-Rubella Vaccine and Autistic Spectrum Disorder: Report From the New Challenges in Childhood Immunizations Conference Convened in Oak Brook, Illinois, June 12-13, 2000", PEDIATRICS, 2001 Yayın	<%1
53	D MACFABE, D CAIN, K RODRIGUEZCAPOTE, A FRANKLIN, J HOFFMAN, F BOON, A TAYLOR, M KAVALIERS, K OSSENKOPP. "Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: Possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders", Behavioural Brain Research, 2007 Yayın	<%1
54	Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, 2015. Yayın	<%1
55	ULAY, Halime Tulay and ERTUĞRUL, Aygün. "Otizmde beyin görüntüleme bulguları: Bir gözden geçirme", Türkiye Sinir ve Ruh Sağlığı	<%1

Derneği, 2009.
Yayın

Alıntıları çıkart	üzerinde	Eşleşmeleri çıkar	< 5 words
Bibliyografyayı Çıkart	üzerinde		

9. ÖZGEÇMİŞ

25.06.1995 doğumlu olup; doğum yeri Eskişehirdir. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra 2014 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanmıştır. 2018 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümününden dönem üçüncüsü olarak mezun olmuş ve 2018 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalındaki yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir.

İletişim Adresleri:

Cep Telefonu: (0537) 694 04 06

E-postası: sumeyyebaser06@gmail.com