



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA  
TEZİ**

**DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER  
NERVUS VAGUS STİMÜLASYONUNUN PRO-İNFLAMATUAR VE  
ANTI-İNFLAMATUAR SİTOKİNLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**HALE GÖK DAĞIDIR**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**OCAK 2023**



**DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER NERVUS  
VAGUS STİMÜLASYONUNUN PRO-İNFLAMATUAR VE ANTI-  
İNFLAMATUAR SİTOKİNLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Hale GÖK DAĞIDIR**

**DOKTORA TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2023**

DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER NERVUS VAGUS  
STİMÜLASYONUNUN PRO-İNFLAMATUAR VE ANTİ-İNFLAMATUAR  
SİTOKİNLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Hale GÖK DAĞIDIR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Bu tez çalışmasında otizm hayvan modelinde çift taraflı transkutanöz auricular vagus sinir stimülasyonu yaparak nöroinflamasyon hakkında bilgi elde etmek amaçlanmıştır. Otizm modeli, C57BL/6 gebe farelere embriyonik dönemin 12,5'inci gününde valproik asit uygulayarak gerçekleştirilmiştir. OFT, EPM, MCT, TCT olmak üzere 4 farklı davranış deneyi ile de hayvanların davranış deneyleri sağlanmıştır. Çalışma için 3 grup oluşturulmuştur; Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu (KOTASG), Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG), Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG). Her grupta 8 dişi 8 erkek fare olmak üzere 16 fare yer almıştır (N=48). KOTASG grubuna genel anestezi altında transaurikular vagus sinir stimülasyonu uygulanmıştır. Üç grubunda kan ve beyin dokularını kullanarak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler ELİSA yöntemi ile incelenmiştir. Kanlarda IL 1 Beta, IL 6, IL 10, IL 22, TNF-alfa ve beyin dokularında NLRP3 düzeylerine bakılmıştır. TNF-alfa parametresi tüm denekleri cinsiyete göre kıyasladığımızda dişiler ve erkekler arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ), IL10 ve IL22 kanda, NLRP 3 parametresi beyin dokusunda gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Otizmin altında yatan mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılmadığı için şu anda davranışsal kriterlere göre teşhis edilmektedir. Erken teşhis kritiktir bu nedenle biyobelirteç keşfi büyük önem taşımaktadır. İnflamasyon otizmin hem etiyolojisinde hem de potansiyel biyobelirteçlerinde önemli bir yere sahiptir. Vagus siniri onuncu ve en uzun kranial sinirdir, bu sinirin stimülasyonu otizmde terapötik bir hedef olarak umut vaatetmektedir. İnsidansı hızla artan bu nörogelişimsel bozukluğu daha iyi anlamak, erken teşhisini sağlamak, biyobelirteç bulmak ve tedavi yöntemleri geliştirebilmek için yeni çalışmaların yapılması büyük öneme sahiptir. Çalışmamız vagus sinir stimülasyonunun sitokinlere etkileri ve otizm ve inflamasyon ilişkisi konusunda bilim dünyasına veri sağlamıştır, bu nedenle ileride bu alanda gerçekleştirilecek çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Bilim Kodu : 1090, 10105.06  
Anahtar Kelimeler : Otizm, Vagal stimülasyon, Sitokinler  
Sayfa Adedi : 112  
Danışman : Prof. Dr. Neslihan BUKAN  
İkinci Danışman : Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU

INVESTIGATION OF THE TRANSAURICULAR VAGAL NERVE STIMULATION  
EFFECTS IN EXPERIMENTAL AUTISTIC MICE MODEL ON PRO AND ANTI  
INFLAMMATORY CYTOKINES

(PH.D. Thesis)

Hale GÖK DAĞIDIR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

In this thesis, it was aimed to obtain information about neuroinflammation by performing bilateral transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in an autism animal model. The autism model was performed by administering valproic acid to C57BL/6 pregnant mice on day 12.5 of the embryonic period. Behavior experiments of animals were also provided with 4 different behavioral experiments: OFT, EPM, MCT, TCT. Three groups were formed for the study; Chronic Autism Transcutaneous Auricular Stimulation Group (KOTASG), Chronic Autism Control Group (KOKG), Chronic Healthy Control Group (KSKG). Each group included 16 mice, 8 females and 8 male mice (N=48). Transauricular vagus nerve stimulation was applied to the KOTASG group under general anesthesia. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were investigated by ELISA method using blood and brain tissues in three groups. The levels of IL 1 Beta, IL 6, IL 10, IL 22, TNF-alpha in blood samples and NLRP 3 in brain tissues were investigated. TNF-alpha parameter was found to be significantly different between females and males when we compared all subjects according to gender ( $p<0,05$ ), IL10 and IL22 were found to be significantly different in blood tissue, NLRP 3 parameter was found to be significantly different between groups in brain tissue ( $p<0,05$ ). As the underlying mechanisms of autism have not been sufficiently elucidated, it is currently diagnosed according to behavioral criteria. Early diagnosis is critical, so biomarker discovery is of great importance. Inflammation has an important place in both the etiology and potential biomarkers of autism. The vagus nerve is tenth and longest cranial nerve, stimulation of this nerve is promising as a therapeutic target in autism. It is of great importance to carry out new studies to better understand this neurodevelopmental disorder, whose incidence is increasing rapidly, to provide early diagnosis, to find biomarkers and to develop treatment methods. Our study provided data on the effects of vagus nerve stimulation on cytokines and the relationship between autism and inflammation, so we think that it will shed light on future studies in this field.

Science Code : 1090, 10105.06  
Key Words : Autism, Vagal stimulation, Cytokines  
Page Number : 112  
Supervisor : Prof. Dr. Neslihan BUKAN  
Co-Supervisor : Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, her yönleri ile örnek edindiğim, hayatın her alanında elimden tutan, çok kıymetli ve güler yüzlü tez danışmanlarım Prof. Dr. Neslihan Bukan ve Prof. Dr. Meltem Bahçelioğlu'na,

İnsan beyni ve Nörobilim öncelikli alanında YÖK 100/2000 programı ile çalışmalarımı destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na,

Tez çalışmamı TDK-2021-7245 ve 76/2020-01 proje numaraları ile destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine,

Gazi Üniversitesi Nöropsikiyatri Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (NPM) ve Gazi Üniversitesi Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (NÖROM),

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'ne (GÜDAM),

Değerli bilgi birikimlerini benimle paylaşan, her zaman desteklerini esirgemeyen tüm Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Nörobilim Bilim Dalı ve Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Western Blot ve Elisa Analizleri Kursu eğitmenim Uz. Biy. Damla Serpil Serin'e, analizlerimde tecrübe ve demeyimlerini benimle paylaşan Arş. Gör. Dr. Tayfun Kuçlu ve Arş Gör. Dr. Zakir Osmanov'a,

Bu günlere gelmemde en büyük payı olan, eğitime çok değer veren, benim mutluluklarımla mutlu olan, aldığım her kararda arkamda duran, çalışmalarımı destekleyen canım anne babama, sevgili abime, yol arkadaşıma ve oğlum Bulut'a...

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                         | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------|--------------|
| ÖZET .....                                              | iv           |
| ABSTRACT.....                                           | v            |
| TEŞEKKÜR.....                                           | vi           |
| İÇİNDEKİLER .....                                       | vii          |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                               | ix           |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                 | x            |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                | xi           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                            | xii          |
| 1. GİRİŞ.....                                           | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                 | 5            |
| 2.1. Bebeklik ve Çocuklukta Nörolojik Hastalıklar ..... | 5            |
| 2.2. Otizm.....                                         | 6            |
| 2.2.1. Tanım ve tarihçe.....                            | 6            |
| 2.2.2. Klinik belirtiler .....                          | 9            |
| 2.2.3. Etiyoloji.....                                   | 12           |
| 2.2.4. Otizm ve hayvan çalışma modelleri .....          | 18           |
| 2.2.5. Vagal sinir stimülasyonu ve otizm .....          | 20           |
| 2.2.6. Otizm ve sitokinler .....                        | 21           |
| 2.2.7. Otizm ve biyobelirteç arayışı.....               | 24           |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                | 43           |
| 3.1. Yavrular .....                                     | 44           |
| 3.1.1. Kronik etkilerin incelendiği gruplar .....       | 44           |
| 3.1.2. Davranış deneyleri .....                         | 46           |

|                                                                                             | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.1.3. TVNS .....                                                                           | 46           |
| 3.1.4. Kan ve dokuların toplanması ve deneye hazır hale getirilmesi .....                   | 47           |
| 3.2. ELİSA Uygulaması.....                                                                  | 51           |
| 3.3. Araştırma Verilerinin İstatiksel Analizi.....                                          | 54           |
| 4. BULGULAR.....                                                                            | 57           |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                            | 69           |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                   | 81           |
| KAYNAKLAR .....                                                                             | 85           |
| EKLER.....                                                                                  | 95           |
| EK-1. Etik Kurul Onayı .....                                                                | 96           |
| EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası .....                                           | 98           |
| EK-3. BAP Proje Kabul Evrakı .....                                                          | 99           |
| EK-4. Dokuları Kullanılan Araştırmanın G.Ü.ET-20.029 Kod Numaralı Etik Kurul Onayı<br>..... | 100          |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                              | 102          |



## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                          | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. Kronik dönem etkilerin inceleneceği grupların dağılımı .....                                                        | 45    |
| Çizelge 3.2. Deneklerin sakrifiye tarihleri .....                                                                                | 50    |
| Çizelge 3.3. Deneyde kullanılan ELİSA kitleri .....                                                                              | 52    |
| Çizelge 4.1. Serumda incelenen parametrelerin (pg/ml) tüm dişi ve erkek denekler arasında belirlenen median ve p değerleri ..... | 58    |
| Çizelge 4.2. İncelenen serum parametrelerinin her grupta dişi ve erkek denekler açısından p değerlerinin karşılaştırılması.....  | 60    |
| Çizelge 4.3. Serumda incelenen parametrelerin (pg/ml) gruplara göre median değerleri .....                                       | 62    |
| Çizelge 4.4. Beyin dokusunda incelenen NLRP 3'ün (ng/ml) gruplara göre median değerleri .....                                    | 63    |
| Çizelge 4.5. Beyin ve serum örneklerinde incelenen parametrelerin birbiri ile ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları.....    | 64    |
| Çizelge 4.6. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin birbiri ile olan korelasyon ilişkisi.....                                 | 66    |
| Çizelge 4.7. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOTASG ve KOKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri .....     | 67    |
| Çizelge 4.8. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOTASG ve KSKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri .....     | 67    |
| Çizelge 4.9. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOKG ve KSKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri .....       | 68    |

## ŞEKİLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                            | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sistemi arasındaki iletişim ..... | 22    |
| Şekil 4.1. Araştırmaya katılan bireylerin cinsiyet dağılımı .....                | 57    |
| Şekil 4.2. Grupların IL 10 (pg/ml) bakımından karşılaştırılması .....            | 59    |
| Şekil 4.3. Grupların IL 22 (pg/ml) bakımından karşılaştırılması .....            | 60    |
| Şekil 4.4. Grupların NLRP 3 (ng/ml) bakımından karşılaştırılması .....           | 61    |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 3.1. TVNS. Farelerde genel anestezi altında, vagustim cihazı ile trans auricular Vagus sinir stimülasyonu (C57BL/6) .....       | 47    |
| Resim 3.2. Dokuların soğuk havan tekniği ile homojenizasyonu .....                                                                    | 49    |
| Resim 3.3. T-PER TM Tissue Protein Extraction Reagent .....                                                                           | 50    |
| Resim 3.4. Combiwash Human marka ELISA plate yıkayıcı görüntüsü.....                                                                  | 53    |
| Resim 3.5. Chromate marka ELİSA okuyucu görüntüsü .....                                                                               | 54    |
| Resim 4.1. Beyin (NLRP 3) ve Serum örneklerinde incelenen parametrelerin birbiri ile korelasyon ilişkisini gösteren p değerleri ..... | 65    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklamalar

%

Yüzde

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

**ACGH**

Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

**AI**

Alüminyum

**APA**

Amerikan psikiyatri birliği

**ASD**

Otizm spektrum bozukluğu

**AVP**

Arginin vazopressin

**BA**

Baryum

**BDNF**

Beyin türevli nörotrofik faktör

**BOS**

Beyin omurilik sıvısı

**CBC**

Tam kan sayımı

**CHD8**

Kromodomain helikaz DNA bağlayıcı 8

**CMA**

Kromozom mikroyarray

**CN**

Kraniyal sinir

**CNS**

Merkezi sinir sisteminin

**CP**

Serebral palsi

**CR**

Krom

**CU**

Bakır

**DEHP**

Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu

**DMN**

Dorsal motor nükleus

**DNA**

Deoksiribo nükleik asit

**DSM**

Zihinsel bozuklukların tanısal ve istatistiksel el kitabı

**DZ**

Dizigotik

**EEG**

Elektroensefalografi

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|               |                                                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EPM</b>    | Yükseltilmiş artı labirent                                                           |
| <b>ETZ</b>    | Elektron taşıma sistemi                                                              |
| <b>FISH</b>   | Floresan in situ hibridizasyon                                                       |
| <b>FOCM</b>   | Folat bağımlı tek karbon metabolizması                                               |
| <b>FRAA</b>   | Folat reseptör alfa otoantikorları                                                   |
| <b>GABA</b>   | Gama aminobütirik asit                                                               |
| <b>GDD</b>    | Küresel gelişimsel gecikme                                                           |
| <b>GER</b>    | Gen ekspresyon düzenlemesi                                                           |
| <b>GSH</b>    | Oksitlenmiş glutatyon                                                                |
| <b>GÜDAM</b>  | Gazi üniversitesi laboratuvar hayvanları yetiştirme ve deneysel araştırmalar merkezi |
| <b>HG</b>     | Cıva                                                                                 |
| <b>HPA</b>    | Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen                                                    |
| <b>ICD</b>    | Uluslararası hastalık sınıflaması                                                    |
| <b>ID</b>     | Zihinsel yetersizlik                                                                 |
| <b>IGF1</b>   | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1                                                     |
| <b>KOKG</b>   | Kronik otizm kontrol grubu                                                           |
| <b>KOTASG</b> | Kronik otizm transcutanöz auricular stimülasyon grubu                                |
| <b>KSKG</b>   | Kronik sağlıklı kontrol grubu                                                        |
| <b>Lİ</b>     | Lityum                                                                               |
| <b>LMR</b>    | Lenfosit-monosit oranı                                                               |
| <b>MCT</b>    | Ayna odası testi                                                                     |
| <b>MIA</b>    | Maternal immün aktivasyon                                                            |
| <b>MN</b>     | Manganez                                                                             |
| <b>MRG</b>    | Manyetik rezonans görüntüleme                                                        |
| <b>MRI</b>    | Manyetik rezonans görüntüleme                                                        |
| <b>MTHFR</b>  | Metilentetrahidrofolat redüktaz                                                      |
| <b>MZ</b>     | Monozigotik                                                                          |
| <b>NC</b>     | Nöronal iletişim                                                                     |
| <b>NLR</b>    | Nötrofil-lenfosit oranı                                                              |
| <b>NTS</b>    | Nukleus traktus solitarius                                                           |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| <b>OFT</b>  | Açık alan testi               |
| <b>OT</b>   | Nörohormon oksitosin          |
| <b>PB</b>   | Kurşun                        |
| <b>PUFA</b> | Çoklu doymamış yağ asitleri   |
| <b>RFC</b>  | Redükte folat taşıyıcısı      |
| <b>RNS</b>  | Reaktif nitrojen türleri      |
| <b>ROS</b>  | Reaktif oksijen türleri       |
| <b>SAH</b>  | S-adenosil-L-homosistein      |
| <b>SAM</b>  | S-adenosil-L-metiyonin        |
| <b>SCI</b>  | Sistemik kronik inflamasyon   |
| <b>SE</b>   | Selenyum                      |
| <b>SN</b>   | Kalay                         |
| <b>SNP</b>  | Tek nükleotid polimorfizmi    |
| <b>TCT</b>  | Üç odalı test                 |
| <b>TNF</b>  | Tümör nekroz faktör           |
| <b>TPH</b>  | Triptofan hidroksilaz         |
| <b>TS</b>   | Transsülfürasyon              |
| <b>V</b>    | Vanadyum                      |
| <b>VNS</b>  | Vagus sinir stimülasyonu      |
| <b>VPA</b>  | Valproik asit                 |
| <b>YGB</b>  | Yaygın gelişimsel bozukluklar |
| <b>ZN</b>   | Çinko                         |

## 1. GİRİŞ

Otizm, karşılıklı sosyal etkileşim ve iletişim becerilerinde gecikme ve sapmalar, stereotipik davranışlar, daralmış ilgi alanı ve sınırlı aktiviteler ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Prognoz, zihinsel engelliliğin varlığından büyük ölçüde etkilenir. Otizm erkek çocuklarda kız çocuklarına oranla yaklaşık dört kat daha fazla görülmektedir. Otizm ilk kez 1943 yılında psikiyatrist Leo Kanner tarafından başkalarıyla iletişimde sorunları olan ve çevrelerindeki değişikliklere karşı yüksek hassasiyet gösteren çocuklarda görülen bir bozukluk olarak tanımlanmıştır ve yaygınlığı o zamanlardan günümüze kadar istikrarla artmıştır [1, 2]. Otizm prevalansı son yıllarda dramatik bir şekilde artmıştır ve veriler dünya genelinde yaygınlıktaki yükselişi doğrulamaktadır. Otizmin Dünya çapında nüfus da yaygınlığı yaklaşık % 1'dir. Otizmin erken teşhisi önemlidir, ilaçlar uyumsuz davranışlar ve eşlik eden psikiyatrik durumlar için yardımcı tedavi olarak kullanılabilir, ancak Otizm Spektrum Bozukluğunun (Autism Spectrum Disorders- ASD) tüm semptomları için etkili olan tek bir tıbbi tedavi yoktur [2, 3].

Otizme neden olan patojenik mekanizma henüz net olarak açıklanamamıştır. Otizme genetik yatkınlık ilk olarak 1977'de 11 monozigotik (MZ) ve 10 dizigotik (DZ) ikiz çiftinde otistik bozukluk uyumluluğunu karşılaştıran bir çalışmada bildirilmiştir. Otistik bozukluğu olan bireylerin kardeşleri arasında otistik bozukluğun yaygınlığı %2 ile %6 arasında değişmektedir [4, 5]. Bağışıklık sistemi ile otizmi birbirine bağlayan yol, mevcut verilerdeki sınırlılıklar ve otizme yol açan nörogelişimsel sürecin doğası ve zamanlaması hakkındaki belirsizlik nedeniyle hala net değildir. Otizm tanılı çocuklardan alınan beyin omurilik sıvısı ve periferik kan örneklerindeki anormal düzeylerdeki nöral antijenler, immünoglobulinler, inflamatuvar sitokinler ve atipik otoantikor seviyeleri bağışıklık sistemlerinin düzensizliğine ve / veya dismatürasyonuna işaret eder. Otizmlili bireylerden alınan post mortem merkezi sinir sistemi dokusu, özellikle serebellumda, kronik inflamatuvar bir süreci temsil ettiği düşünülen doğuştan gelen bağışıklık sistemi anormalliklerinin kanıtlarını gösterir. [6-8]. Nörotransmitterler, nöropeptidler ve nörotrofinler, bağışıklık ve endokrin sistemlerini içeren karmaşık iletişim ağları aracılığıyla nörogelişim ve sinirsel işlevini düzenleyen protein sinyal molekülleri aileleridir ve otizmin etiyolojisine potansiyel katkıları vardır [9]. Ayrıca otizmin etiyolojisinde endokrin faktörler, obstetrik faktörler, neonatal faktörler, ksenobiyotik maruziyeti, çevresel faktörler, hamilelik döneminde kullanılan bazı ilaçlar, ağır metaller, endokrin bozucular, alkol sigara ve uyuşturucu madde kullanımının da yer aldığını

gösteren araştırmalar mevcuttur [5]. Beyinde bir dizi nöroanatomik anormalliğin ASD ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Birçok çalışma ASD'de serebellar anormallikler bildirmiştir, ASD'li bireylerin beyinlerinin post mortem analizinde gözlemlenen en tutarlı nöroanatomik anormalliklerden biri, esas olarak posterolateral neoserebellar ve arkiserebellar kortekslerdeki Purkinje hücrelerinin boyutunda ve sayısında önemli bir azalmadır. Purkinje nöronları serebellumun tek çıktısı olduğundan, bu bulguların büyük fonksiyonel önemi olabilir. Bir dizi çalışma otizmlili bireylerde erken yaşlarda artan amigdala hacmini bildirmiştir, nöron sayısında azalma bildiren araştırmalarda mevcuttur. Frontal korteks, karar verme, planlama, işleyen bellek, duygular, sosyal davranış, öğrenme ve iletişim gibi üst düzey bilişsel süreçler de dâhil olmak üzere beynin yürütücü işlevlerinin çoğunu kontrol eder. ASD'de görülen sosyal etkileşim ve duygu bozuklukları nedeniyle frontal korteks de son yıllarda oldukça ilgi gören bir beyin bölgesi olmuştur. ASD'deki ana gözlemler, anormal kortikal büyüme paternlerini, kortikal kalınlıktaki anormallikleri ve kortikal katmanlar boyunca nöronların düzensizliğini ve bunların beynin diğer bölgeleriyle olan bağlantılarını içerir.[10]. Otizmin belirtilerinin pozitif yönde azalmasına neden olan girişimsel çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri “vagal stimülasyon”dur. Merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sistemi çeşitli şekillerde birbirine bağlıdır. Hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklığın kollarının otizmin patofizyolojisine dâhil olduğu varsayılmaktadır. Yardımcı T hücreleri, sitokinler üreterek doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin işlevini düzenler. Psikonöroimmünolojik disiplin göz önüne alındığında, sitokinler nörotrofik etkileri yoluyla nöronların fonksiyonel bütünlüğü için gerekli desteği sağlar. Bununla birlikte, aşırı üretimleri, nöroanatomik yapılarda ve nöronal plastisitede bozulmalara neden olan immüno-sitotoksositeye yol açar. Pro-inflamatuar sitokinlerin ve özellikle tümör nekroz faktörün (TNF) otistik deneklerin serumunda arttığı gözlenen çalışmalar bulunmaktadır. Otizm tanılı çocukların daha yüksek konsantrasyonda IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 ve IL-13 seviyelerine sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ve interleukinlerin tanıda potansiyel biyobelirteç olabileceği yönünde görüşler mevcuttur. Otistik çocuklarda BDNF ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin normal çocuklara göre daha yüksek olduğunu ortaya koyan çalışmalar da vardır ve etkilerini vagus sinirinden efferent lifler aracılığıyla uygulamaktadır [11-13].

ASD için henüz spesifik bir tedavi mevcut değildir. Bu yüzden genetik, nöral ve farmakolojik manipülasyonlar ile ASD araştırmalarında hayvan çalışmaları gereklidir. Hayvan çalışmaları, insan çalışmalarından farklı olarak, hastalığın patogenezinde genetik ve



çevresel faktörlerin rolünün kısıtlanmasını, bununla birlikte ASD'de değişen beyin fonksiyonu ve davranış arasındaki ilişkilerin çözülmesini mümkün kılar [14]. ASD bozuklukları için belirlenen hayvan modelleri bir veya birkaç otizm belirtisi göstermektedir (bilişsel katılık, sosyal etkileşimlerin ihlali ve nitel iletişim bozuklukları). İlgili simülasyonlar ya genetik mühendisliği teknikleri (nakavt sıçanlar ve fareler) ya da belirli çevresel faktörlerin erken (doğum öncesi ya da doğum sonrası) etkileri kullanılarak gerçekleştirilir. Model hayvanların davranışsal durumlarını değerlendirmek için davranış deney yöntemleri kullanılmaktadır. Bunların bir kısmı “klasik” (ör. Açık alan testi, Morris su labirenti, T benzeri labirent ve radyal labirent) diğerleri ise otizm modelleri için özel olarak tasarlanmıştır [15, 16].

Araştırmamızın amacı otistik hayvan modelinde çift taraflı transkutanöz auricular vagus sinir stimülasyonu yaparak nöroinflamasyon hakkında veri elde etmek ve otizmin patofizyolojisi hakkında daha net bilgilere sahip olmaya çalışarak semptomları ve tedavisi hakkında literatüre katkı sağlamaktır. Ayrıca Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinleri inceleyerek biyobelirteç alanında yapılan araştırmalara katkı sağlamaktır. Otizmin patofizyolojisinin henüz net olarak açıklanamamış olmasından dolayı ve alanda biyobelirteçlere duyulan büyük ihtiyaç sebebi ile bu alanda yapılan çalışmalar otizmi daha iyi anlayabilmek adına büyük öneme sahiptir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Bebeklik ve Çocuklukta Nörolojik Hastalıklar

Bebeklik ve çocukluk döneminin nörodejeneratif hastalıkları, merkezi sinir sisteminin yapısal anormalliklerinden dolayı ilerleyici nörolojik fonksiyon kaybının olduğu bozuklukları içerir. Çoğu nadiren görülen altı yüzden fazla rahatsızlık bu kategoriye dâhil edilebilir [17]. "Nörolojik bozukluk" terimi, beynin veya sinir sisteminin bir bölümünde fiziksel ve / veya psikolojik semptomlarla sonuçlanan bir işlev bozukluğunun neden olduğu herhangi bir durum için geçerlidir. İnsan beyninin gelişimi hamilelikte başlar ve bebeklik, çocukluk ve ergenlik dönemine kadar devam eder. Çoğu beyin hücresi doğumdan önce oluşur, ancak bu sinir hücreleri (nöronlar) arasındaki trilyonlarca bağlantı bebeklik dönemine kadar gelişmez. Belirtiler, hasarın nerede oluştuğuna bağlıdır. Hareketi, iletişimi, duymayı veya düşünmeyi kontrol eden alanlar etkilenebilir. Nörolojik bozukluklar çok çeşitlidir. Çeşitli nedenleri, komplikasyonları ve sonuçları vardır. Çoğu, ömür boyu yönetim gerektiren ek ihtiyaçlarla sonuçlanır. Nörolojik bozuklukların semptomları değişiklik gösterir. Fiziksel, bilişsel, duygusal ve davranışsal semptomlar, bu semptomların kombinasyonlarına veya kümelerine sahip spesifik bozukluklarla birlikte mevcut olabilir. Örneğin, serebral palsi (CP) daha fazla fiziksel semptom gösterme eğilimindeyken, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) davranış üzerinde daha büyük etkilere sahip olma eğilimindedir. Pek çok nörolojik bozukluk “doğuştandır”, yani doğumda mevcuttur. Ancak bazı bozukluklar “edinilmiş” olup, bu da doğumdan sonra geliştiklerini gösterir. Nedeni bilinmeyenler "idiyopatik" olarak adlandırılır [18, 19]. Nörolojik bozuklukların doğuştan gelen nedenleri arasında genetik mutasyonlar, kromozom anomalileri, metabolik bozukluklar, konjenital malformasyon yer alırken pre-perinatal nedenler arasında toksinler ve çevresel faktörler, beslenme eksiklikleri, enfeksiyonlar, hipoksi, asfiksi, doğum sonrası komplikasyonlar, prematüre, düşük doğum ağırlığı gibi nedenler yer almaktadır. Doğumdan sonra gelişen nedenler arasında; bağışıklık bozukluğu, doğum sonrası enfeksiyonlar, travmatik beyin hasarı, omurilik yaralanmaları, tümörler, toksin maruziyeti yer almaktadır [19, 20].

Nörolojik bozukluklardan biri olan otizm, daha çok davranış temelinde teşhis edilen heterojen bir nörogelişimsel bozukluklar grubudur. Tanınma yaşı genelde 0-36 ay arasındadır, cinsiyet oranı ele alındığında; erkeklerde kız çocuklarından daha fazla görülmektedir. Beceri

kaybı değişkendir, sosyal beceriler ve iletişim yetenekleri genellikle çok azdır. Nöbet bozukluğu yaygındır. IQ aralığı şiddetli mental retardasyondan normale değişkenlik gösterir [21]. ASD ve nörotipik beyinler arasında tanımlanan en ilgi çekici anatomik farklılıklardan bazıları serebellum, amigdala, frontal korteks, kortikal mikro yapılar gibi beyin bölgelerinde belirlenen anormalliklerdir [10].

## 2.2 Otizm

### 2.2.1 Tanım ve tarihçe

'Otizm', benlik anlamına gelen Yunanca 'autos' kelimesinden gelmektedir. Otizm, ilk olarak 1943'te Leo Kanner tarafından, başkalarıyla normal duygusal temas kurmakta doğuştan gelen bir yetersizlik olarak tanımlanmıştır ve böylece Kanner erken çocukluk otizminin ilk sistematik tanımını yayınlamıştır. Sonraki yıllarda tanısal sınıflandırmadaki revizyonlar, ailelerde daha geniş otizm fenotiplerinin tanımlanması, gelişimsel modeller, genetiğin öneminin anlaşılması ve genetik metodolojideki ilerlemeler, nörogörüntülemede gelişmeler hem mutant fare modellerinde hem de transgenik primat modellerinde olduğu gibi hayvan modellerindeki gelişmeler, otizmin tanıma yenilikler getirmiştir. Leo Kanner 1943'te klasik davranışları tanımlamış olsa da, bozukluğun 'Zihinsel Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı, 3. baskı' (DSM III)'e ayrı bir hastalık olarak dâhil edilmesi 1980 yılını bulmuştur [22, 23].

Kanner tarafından 1943'te gerçekteştirilen araştırmada, Kanner'in çalışmaya katılan çocuklarda gözlemlediği bazı özellikler; ısrar, endişe, öfke nöbetleri, kelimeleri anlamından farklı kullanma, doğru cümlelerle iletişim kuramama, el çırpma, vücut sallama şeklindedir. Ayrıca konuşmanın büyük bir kısmını tekrarlayan soruların oluşturması, etraftakilere ilgisizlik, parmak emme veya nesneleri ağzına alma, yalnızlık, dünyayı belli bir rutinde yaşama, aynılığı sürdürmede ısrarcılık ve rutinin dışını tolere edememe de gözlemleri arasında yer alır. Kanner'e göre; saplantılar, stereotipi ve ekolali kombinasyonu temel şizofrenik olayların bazıları ile ilişkili olsa da, bu benzerliğe rağmen, gözlemlediği bu davranışlar çocukluk dönemindeki şizofreninin tüm diğer bilinen örneklerinden birçok açıdan farklıdır [22].

Otizme genetik yatkınlık ilk olarak 1977'de ikiz kardeşlerde otistik bozukluk uyumluluğunu karşılaştıran bir çalışmada bildirilmiştir [4, 5].

1980'de Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) otizmi mental bozuklukların tanısal ve istatistiksel klavuzunda (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSM-3) ayrı bir kategori olarak tanımış ve onu infantil otizm olarak tanıtmıştır. 1994'de otizm yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) içinde DSM-4'te tanıtılmıştır [24].

Otizm spektrum bozukluğunun genetik, ailesel ve çevresel etmenlerden kaynaklanan bir bozukluk olarak tanımlanmasından günümüze kadar geçen süre içinde beyin anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve işlevleri alanında yapılan çalışmalarla, bu karmaşık sendromun nörobiyolojik bir sendrom olduğu ve bu nedenle bireyin sosyal ilişkileri, iletişim becerileri, ilgi alanları ve davranışlarını olumsuz etkilediği konusunda önemli bilgiler sağlamıştır [25, 26]. Bu özel tanı özelliklerine ek olarak, diğer spesifik olmayan bir dizi sorun; fobiler, uyku ve yeme bozuklukları, öfke nöbetleri, anksiyete, depresyon, kendine zarar verme yaygındır [27-31]. Otizimli bireyler; sosyal biliş ve sosyal algı bozukluğu, atipik algı ve bilgi işleme gibi bilişsel profillere sahiptir. Genetik ve çevresel faktörler otizmin altında yatan sebepler arasında anahtar bir role sahiptir. Hastalığın ortaya çıkışında pek çok faktör arasındaki etkileşimler gösterilmektedir [2, 3].

### Komorbid durumlar

1) Bilişsel Bozukluk [Küresel gelişimsel gecikme (Global developmental delay GDD) veya Zihinsel yetersizlik (Intellectual disability ID)]: Bu, %50-70 bireylerde bildirilmiştir. Geniş değişkenlik, değerlendirme yöntemlerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Değerlendirme, ağırlıklı olarak sözel olmayan becerilere dayanan araçlarla yapılmalıdır.

2) Epilepsi: Bimodal prezentasyonda (bebeklik ve ergenlik) tüm nöbet tipleri %25-30 oranında görülür.

3)Psikiyatrik Hastalıklar: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite bozukluğu, Depresyon, Anksiyete ve Obsesif-Kompulsif bozukluklar.

4) Beslenme Bozuklukları: Bunlar çiğneme azalma, gıda kabulünde azalma, aşırı gıda seçiciliği, gıdadan kaçınma veya yemek zamanı yanlış davranışlarını içerir.

5) Gastrointestinal Hastalıklar: Anormal disbiyotik durumlar, sık kusma, gastroözofageal reflü, tekrarlayan ishal, kronik kabızlık, geçirgen bağırsak sendromu ve tekrarlayan karın ağrısı sık görülen şikâyetlerdir.

6)Uyku Bozuklukları: Uykuya dalmada güçlük, tekrarlanan gece uyanmaları, olağan dışı yatma zamanı rutinleri, gündüz davranış sorunlarının artmasına ve ebeveyn stresine yol açar.

7)Dismorfizm: Bu, %18-20 bireylerde gözlenir (sendromik veya spesifik olmayan dismorfik özellikler) [32].

Tıbbi komorbiditelerin bir arada görülme şekli, diğer nörogelişimsel bozukluklarla karşılaştırıldığında en çok otizmde dikkat çekicidir. Otizm vakalarının çoğunda görülen gastrointestinal problemler, otizmin sadece psikiyatrik bir bozukluk olmadığını, fizyolojik bir temele sahip olduğunu göstermektedir. Bağırsak mikrobiyotası insan sağlığında önemli bir role sahiptir ve otizmde de güncel çalışma konuları arasında yer almaktadır. Fizyolojik homeostaz, glutatyon metabolizması, amino asit metabolizması vb. otizmde bağırsak beyin ekseninin rolünü açıklamada önemli metabolik yollardır [33]. Otizm spektrum bozukluğuna eşlik eden uyku bozukluğunun kesin nedenleri net değildir; bununla birlikte, araştırmacılar genellikle uyku sorunlarının biyolojik, psikolojik ve sosyal / çevresel faktörlerin karmaşık bir kombinasyonundan kaynaklandığını ileri sürmektedir. Obstrüktif uyku apnesi dâhil olmak üzere uyku bozukluklarının belirlenmesi ve tedavisi, otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda gündüz davranışını iyileştirebilir [34]. Otizmde artan ancak değişken bir epilepsi riski vardır. Komorbidite oranı, yaşa ve bozukluğun türüne bağlı olarak değişir ve şu anda komorbidite vakalarının konservatif tahmini tüm spektrumun % 20-25'idir. Nöbet oluşumu için başlıca risk faktörleri; zeka geriliği ve ek nörolojik bozuklukların yanı sıra bazı spesifik ilişkili tıbbi durumlardır. Epilepsi ve otizm arasındaki ilişki, son on yılda kapsamlı bir şekilde tanımlanmış ve belgelenmiştir. Çocuklarda epilepsi prevalansının % 2-3 olduğu, otizmde ise konservatif bir epilepsinin yaklaşık % 25 olduğu bilinmektedir [35, 36]. Epilepsi ve uykunun çift yönlü ilişkileri vardır ve her ikisiyle ilgili sorunlar ASD'li çocuklarda oldukça yaygındır [37].

### 2.2.2. Klinik belirtiler

Otizm tanısının güncel standardı, Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabında (DSM) ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Hastalık Sınıflandırmasında (ICD) tanımlanmıştır. Bu tanımlara ek olarak, farkındalığı ve erken değerlendirmeyi teşvik etmek için ASD tarama araçları mevcuttur. Bu araçların çoğu, tanı tanımlarından ve belgelenmiş davranışsal özelliklerden oluşturulmuştur [38, 39].

Tarama ve izleme, çocuklarda gelişimsel bozuklukların erken tespiti için çok önemli bileşenlerdir. DSM-V kriterlerine göre otizm iki alanda yetersizlikle kendini göstermektedir;

1. Toplumsal iletişim ve etkileşimde güçlükler,

2. Tekrarlayıcı davranış örüntüleri [40].

Otizmli çocuklarda iletişim alanında gözlenen bazı özellikler; az ve tutarsız göz teması, insanları dinlememe eğilimi, adına tepki vermemek, konuşma akışında güçlükler, alışılmadık ses tonu, başka bir kişinin bakış açısını anlamakta güçlük çekmek şeklindedir. Tekrarlayıcı davranışlar alanında gözlenen bazı özellikler; belirli konulara sürekli yoğun ilgi, rutindeki küçük değişikliklere tepki, ışık, gürültü, sıcaklık gibi duyuşal girdilere diğer insanlardan daha duyarlı ya da daha az duyarlı olmak, uyku sorunları ve sinirlilik, hareket eden nesnelere aşırı ilgi şeklindedir [21].

ICD-10 ( International Classification of Diseases 10th / Hastalıkların ve Sağlık Sorunlarının Uluslararası Sınıflama Sistemi) Çocukluk otizmi için Kriterler (F84.0) ;

A. Aşağıdaki alanlardan en az birinde anormal veya bozulmuş gelişim 3 yaşından önce belirgindir:

1. sosyal iletişimde kullanılan alıcı veya ifade edici dil;
2. seçici sosyal bağların veya karşılıklı sosyal etkileşimin gelişimi;
3. işlevsel veya sembolik oyun.

B.(1), (2) ve (3) 'ten toplam en az altı semptom bulunmalı en az ikisi (1)'den olmalıdır , (2) ve (3)' ün her birinden en az bir tane olmalıdır.

1.Sosyal etkileşimdeki niteliksel bozukluklar, aşağıdaki alanlardan en az ikisinde kendini gösterir:

- a. sosyal etkileşimi düzenlemek için göze bakışı, yüz ifadesini, vücut duruşlarını ve jestleri yeterince kullanamama;
- b. karşılıklı ilgi, aktivite ve duygu paylaşımını içeren akran ilişkileri geliştirememesi (zihinsel yaşa uygun bir şekilde ve bol fırsatlara rağmen);
- c. diğer insanların duygularına bozulmuş tepki veya sosyo-duygusal karşılıklılık eksikliği; veya sosyal bağlama göre davranışta değişiklik olmaması; veya sosyal, duygusal ve iletişimsel davranışların zayıf entegrasyonu;
- d. diğer insanlarla keyfi, ilgi alanları veya başarıları paylaşmaya kendiliğinden çaba göstermeme (örneğin, bireyin ilgisini çeken nesneleri başkalarına göstermeme).

2.Aşağıdaki alanlardan en az birinde ortaya çıkan niteliksel anormallikler;

- a. alternatif bir iletişim modu olarak jest veya mimik kullanımıyla telafi etme girişiminin eşlik etmediği konuşma dilinin gelişiminde gecikme veya tamamen yoksunluk;
- b. diğer kişinin iletişimlerine karşılıklı yanıtın olduğu, karşılıklı konuşma alışverişini başlatmada veya sürdürmede göreceli başarısızlık (dil becerisinin mevcut olduğu herhangi bir seviyede);
- c. dilin basmakalıp ve tekrarlayan kullanımı, sözcüklerin veya ifadelerin kendine özgü kullanımı;
- d. çeşitli spontane inandırıcı oyunların veya sosyal taklit oyunlarının eksikliği.

3.Kısıtlanmış, tekrarlayan ve basmakalıp davranış kalıpları, ilgi alanları ve faaliyetler aşağıdakilerden en az birinde kendini gösterir:

- a. içerik veya odak açısından anormal olan bir veya daha fazla klişeleşmiş ve kısıtlı ilgi modeli ile kapsamlı bir meşguliyet; veya içeriği veya odak noktası olmasa da yoğunluğu ve sınırlı doğası gereği anormal olan bir veya daha fazla ilgi alanı;
- b. belirli, işlevsel olmayan rutinlere veya ritüellere görünüşte zorunlu bağlılık;
- c. ya el ya da parmak çırpma ya da bükülme ya da karmaşık tüm vücut hareketlerini içeren basmakalıp ve tekrarlayan motor davranışları;



d. Oyun malzemelerinin kısmi nesneler veya işlevsel olmayan öğeleriyle meşgul olma (kokuları, yüzeylerinin hissi veya ürettikleri gürültü veya titreşim gibi).

Her olgudan istenmesi önerilen incelemeler; Ayrıntılı tıbbi ve gelişimsel öykü, motor beceriler ve el kullanımı, işitme-görme muayenesi, kromozom analizidir (Array CGH ve FMR-1). Gelişimsel regresyon gösteren olgularda, dismorfizmi olan veya nöbet öyküsü olanlarda bu incelemelere ek olarak; Kromozomal analiz (erkeklerde 15q11-13 monozomi, trizomi, kısmi tetrazomi, kızlarda MECP2), EEG (özellikle yavaş uyku sırasında), MRI, nörometabolik bozukluklar, aminoasit ve mitokondriyal bozukluklar için incelemeler önerilmektedir.

Değerlendirmenin çok disiplinli ve gelişimsel olması gerekir ve erken teşhis, erken müdahale için gereklidir. Erken kapsamlı ve hedefe yönelik davranışsal müdahaleler sosyal iletişimi geliştirebilir, kaygı ve saldırganlığı azaltabilir. İlaçlar komorbid semptomları azaltabilir, ancak sosyal iletişimi doğrudan geliştirmez. Bireyin farklı olduğunu kabul eden ve ona saygı duyan destekleyici bir ortamın yaratılması çok önemlidir [3].

ASD ayrıca immün, endokrin ve bağırsak mikrobiyota sistemleri gibi diğer önemli fizyolojik sistemleri de etkiler [41, 42].

Otizmde beyin gelişimi üzerine yapılan ilk araştırmalardan elde edilen en tutarlı bulgulardan biri, doğumda kafa büyüklüğünün normal olması, ancak 2 ila 3 yaşlarında beyin boyutunun önemli ölçüde büyümüş olmasıdır [43, 44]. Görüntüleme verilerinin yorumlanmasında, belirli beyin alanlarının hacminin ve boyutunun değerlendirilmesinde ve bunların geniş bir otizm fenotipine işlevsel olarak çevrilmesinde birçok tartışma vardır [45]. Nörodejeneratif bozukluklar üzerine yapılan araştırmalar, beyindeki değişikliklerin genellikle klinik belirtilerden önce görüldüğünü göstermiştir. Beyinle ilgili değişikliklerin davranış değişikliklerinden daha erken ortaya çıktığını ve gelecekteki davranışsal tanıyı tahmin etmede faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda ASD tanısı alan bebeklerde beyin farklılıkları 6 aylıken bildirilmiştir; ancak, bu spesifik beyin yapılarında bildirilen grup farklılıkları, ASD'nin erken tespiti için etkili olması gereken duyarlılığı ve özgülüğü henüz göstermemiştir [46].

### 2.2.3. Etiyoloji

ASD, yaygın gelişimsel bozukluklar arasında yer alan nörogelişimsel bir bozukluktur [47, 48]. ASD'ye eşlik eden ek hastalıklar genellikle yaygındır, komorbid durumlara ASD'li bireylerde sık rastlanır [49]. Davranışlar, biyolojik bulgular ve tedaviye yanıtındaki yüksek değişkenlik nedeniyle, birçok uzman, her biri biraz farklı bir etiyolojiye sahip, birçok farklı otizm teorisini varsaymaktadır [35, 36]. 20. yüzyılın sonuna kadar, otizmin nedeni üzerine, genetik araştırmalar dışında, nispeten az miktarda biyokimyasal/nörolojik araştırma yapılmıştır. Otizme genetik yatkınlık ilk olarak 1977'de 11 monozigotik (MZ) ve 10 dizigotik (DZ) ikiz çiftinde otistik bozukluk uyumluluğunu karşılaştıran bir çalışmada bildirilmiştir. 20. yüzyılın sonlarına doğru özellikle, birçok monozigotik ikiz çalışmalarında her ikisinin de %90'ına kadar otistik davranış sergilediği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, kapsamlı çalışmalar, otizm vakalarının sadece %5-10'unda majör mutasyonlar tanımlamıştır [4, 50]. Günümüzde otizmin etiopatogenezi hakkında yapılan araştırmalar pek çok farklı konuya yönelmiştir. Giderek prevalansı artan otizmin altında yatan sebepler arasında; genetik yatkınlık, epigenetik, nörolojik faktörler, metabolik faktörler, psikososyal faktörler, prenatal/postnatal etkenler, hücrel stres, çevresel ve immünolojik faktörler arasındaki etkileşimler gösterilmektedir [2, 25, 51-54]. Ayrıca anne/baba yaşı, hamilelik sırasındaki stres faktörleri, doğum öncesi ağır metaller, etil alkol, zirai ilaçlar, ftalatlar, poliklorlu bifeniller, hava kirliliği gibi toksik kimyasala maruz kalma, gebelikte valproat kullanımı, gebelikte geçirilen çeşitli enfeksiyonlar, maternal diyabet, annenin kilo alımı ve hipertansiyon, gebelik sırasında D vitamini eksikliği, doğum öncesi folat takviyesinin düşük olması ve ya yüksek doz folat, gebelikte beslenme, prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı (<1500 g), yenidoğanda antibiyotik kullanımı ile de otizmi ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur [1, 53, 55-59]. Otizmin altında yatan sebepler hala belirsiz olmasına rağmen, en çok kabul gören nedensellik hipotezi birden çok faktörün karşılıklı etkileşimler ile otizme yol açtığı yönündedir. Bunların nörotransmitter dengesizliğine, işlevsiz nöronal yollara, anormal sinaptogeneze ve nöronal bağlantıya yol açtığı düşünülmektedir [32].

#### Genetik

ASD'li bireylerin yaklaşık %20 kadarı tanımlanabilir genetik anormalliklere sahiptir (majör mutasyonlar ve- ve ya nokta mutasyonları). Bazı genetik ve metabolik bozukluklar (Angelman's, Prader-Willi, Fragile X ve Smith-Lemli-Opitz sendromları) ve çevresel

nedenler (konjenital kızamıkçık, antenatal valproat alımı ve ensefalit) ile güçlü ilişkiler bulunmuştur. Otizmin kız çocuklarına göre erkek çocuklarda yaklaşık dört kat daha fazla görülmesi de genetik yatkınlık ile ilişkilendirilmektedir [32]. Günümüzde moleküler genetik çalışmaları otizme yüzlerce gen varyantının dâhil olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin, 1q21 duplikasyon ve 15q11–q13 duplikasyon sendromları ASD'ler de meydana gelen önemli genetik farklılıklardır. ASD'lerde kromodomain helikaz DNA bağlayıcı 8'in mutasyonları da dikkat çekicidir. Bu genin, transkripsiyonel düzenleme, epigenetik yeniden modelleme, hücre çoğalmasının desteklenmesi ve RNA sentezinin düzenlenmesi gibi çeşitli işlemlerde görev aldığı gösterilmiştir. Bu genin alelik varyantları otizm ile ilişkilendirilmektedir. ASD'ler ile ilişkili varyantlar, çoğunlukla nadirdir ve bireysel baz çiftlerinin (tek nükleotid varyantları (single nucleotide variants-SNV'ler)) mutasyonlarını kapsar; yerdeğiştirmeler (substitution), eklemeler (insertions), ve silmeler (deletions) şeklinde olabilir. Kalıtsal varyanta ek olarak, çok sayıda çalışma, ASD'li bireylerde de novo genetik varyantların oranının arttığını, yani probandda ilk kez tespit edilen ve ebeveyn genomunda bulunmayan varyantların olduğunu göstermiştir [60]. Otizmde komorbid durumların sık görüldüğü artık iyi bilinmektedir ayrıca otizmin güçlü genetik bir yöne sahip olduğu da pek çok araştırma ile gösterilmiştir. Örneğin İsveç'te yapılan ikiz bir araştırma, otizmin hem yüksek oranda kalıtsal olduğunu, hem de genetik varyansının dörtte üçünün DEHB ile paylaşıldığını göstermiştir [61, 62]. Otizm semptomları; Ret sendromu, fragile X, fenilketonüri gibi birçok genetik hastalık ile ilişkili bulunmuştur. Ancak bu genetik hastalıklar otizm vakalarının %10'undan sorumlu bulunmuştur. Aslında, geniş ASD çocuk örneklerinde genomda geniş çapta genetik araştırmalar yapan birçok yeni araştırma, sadece nadir de novo mutasyonları tanımlamış, bu nedenle kalıtsal genetik sendromlardan ziyade DNA bakımından hatalarda ikincil mutasyonlara ve gen-gen, gen-çevre ilişkilerine işaret etmiştir [63, 64]. Epilepsi de otizmle beraber görülen önemli komorbid durumlardan birisidir ve her ikisinde de genetik, çevresel faktörler(ör; düşük doğum ağırlığı, genç gebelik yaşı ve anne ve babanın ileri yaşı), immünolojik faktörler (ör; mikrogliya ve astroglialının anormal aktivasyonu) önemli bir yere sahiptir [65]. Farklı nöropsikiyatrik bozuklukların ortak bir genetik etiyolojiye sahip olduğu görülmektedir, bu da otizme yatkınlık yaratan genleri ortaya çıkarma çabalarında dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir. Gözlemlenen bazı doğum öncesi ve erken yaşam faktörlerinin gen-çevre korelasyonu yoluyla potansiyel olarak otizme katkısı çeşitli araştırmalar ile gösterilmektedir. Bulgular, genetik ve çevresel etkilerin birbirinden bağımsız olmadığını vurgulamaktadır. Otizmin altında yatan potansiyel anahtar biyolojik yolları belirlemek için farklı gen varyantlarının aynı gen ekspresyonu ve protein

ağları üzerinde nasıl birleştiği hala açıklığa kavuşturulması gereken konular arasındadır böylece gen varyantlarının farklı beyin hücre tipleri üzerinde, beynin farklı yerlerinde ve farklı gelişim dönemlerinde nasıl etki gösterdiği de daha net ortaya çıkacaktır [61].

### Epigenetik

Epigenetik, genomda değişiklik olmaksızın gen aktivitesini ve ekspresyonunu etkileyen kromozomdaki değişikliklerle ilgilenir. Epigenetik değişikliklerin en önemli özelliği, DNA dizinini (nükleotidsekansı; ACTG) değiştirmemesidir. Buna rağmen genlerin promotor bölgelerinde neden olduğu düzenleme ile ilgili genin transkripsiyonunda nicel değişikliklere neden olmaktadır. Bu, ilişkili genin transkripsiyonunu baskılayabilir veya serbestleştirebilir. Örneğin DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar; altta yatan genomik dizileri etkilemeden gen ekspresyonunu kalıtsal bir şekilde değiştirmeye katkıda bulunabilir. Epigenetik aktarımın altında yatan mekanizmalar arasında; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, pasif DNA demetilasyonu, spesifik mRNA'ların kalıtımı, kromatin yeniden modellenmesi, şaperonların aktivitesinin etkinleştirilmesi(Ör; Hsp 90) gibi moleküler mekanizmalar yer almaktadır [66]. Çevresel ve epigenetik faktörlerin otizm etiolojisinde önceden düşünülen daha güçlü bir rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır. İnsan genomundaki 28 milyon CpG (CpG bölgeleri veya CG bölgeleri, bir sitozin nükleotidini, 5' → 3' yönü boyunca lineer baz dizisinde bir guanin nükleotidi tarafından takip edilen DNA bölgeleridir) dinükleotidinin yaklaşık %60-80'i metillenmiştir. DNA metiltransferazlar (DNMT), hemimetillenmiş bölgeleri (koruyucu metilasyon) veya spesifik metillenmemiş dizileri (de novo metilasyon) tanır. Gen ifadesinin dinamik açma/kapama anahtarı, DNA demetilasyonuna karşı DNA metilasyonunun dengeli bir eylemini gerektirir. Acosta ve arkadaşları tarafından Johns Hopkins Tıp Fakültesinde gerçekleştirilen çalışmada, epigenetiğin ASD'ye katkısını anlamaya çalışmak için, dorsolateral prefrontal korteks, temporal korteks ve serebellum dâhil olmak üzere üç beyin bölgesinde otizmlili bireylerin ölüm sonrası beyin dokularında DNA metilasyonu (DNAm) incelenmiş ve genom çapında önemli diferansiyel olarak metillenmiş bölgeler (DMR'ler) belirlenmiştir [67]. ASD ile ilgili epigenom alanındaki çalışmaların bazı bulguları arasında, temporal korteksin kromozom 6 ve kromozom 11'in çeşitli genomik lokuslarında DNA'nın hipo- ve hipermetilasyonu yer alır. Diğer bir epigenetik modifikasyon, asetilasyon, deasetilasyon, metilasyon, fosforilasyon vb. yoluyla translasyon sonrası histon modifikasyonlarıdır. Tek histon ve ya histon kombinasyonu, DNA'nın fonksiyonel durumunu belirler. Histon modifikasyonları,

nöronal devrelerin kararlılığını ve plastisitesini etkiler. H3K4Me (histon H3 proteini üzerindeki lizin 4'e üç metil grubunun eklenmesi) ile ilişkili metiltransferazlar, demetilazlar ve benzerleri, otizm gibi nörogelişimsel hastalıklarda değişir. 257 beyin örneği ile yapılan histon asetilasyon çapında ilişkilendirme çalışması, ASD vakalarının %68'inden fazlasında prefrontal ve temporal kortekste ortak bir asetilasyon imzası bulmuştur [66-69]. İlginç bir şekilde, ASD için nadir görülen genetik varyantlar, epigenetik düzenlemenin başka bir yönü olan kromatin yeniden şekillenmesini içerir. Rett Sendromu, Fragile X ve Angelman Sendromunun altında yatan sebepler arasında epigenetik önemli bir yere sahiptir ve her biri ASD ile fenotipik örtüşmeyi paylaşır. Epigenetik değişikliklerin kalıtsal hastalık fenotipleri üzerinde güçlü etkisi olduğu öngörülmektedir [70].

### Nörobiyoloji

ASD'nin altında yatan pek çok faktör ve karmaşık mekanizmaların varlığı nedeni ile nörobiyolojisi hakkında henüz az şey bilinmektedir. Araştırmacılar beyin büyümesi, işlevsel sinir ağları, nöropatoloji, elektrofizyoloji ve nörokimyası inceleyerek otizmin nörobiyolojik yönünü aydınlatmaya çalışmaktadır. ASD ile bağlantılı nadir varyantların analizi, üç ortak biyolojik yolu işaret etmektedir; kromatin yeniden şekillenmesi, sinaptik hücre adezyonu ve sinaptik farklılaşma ve nöronal sinyalleşme ve gelişme [48]. Otizm araştırmasının temel zorluklarından biri, biliş ve duyurun çeşitli yönlerini birleştiren ortak noktayı belirlemektir. Otizimli bireyler, 'ağaçları görüyor ama ormanı değil' , hangi nörobiyolojik değişiklikler, sosyal biliş ve duyuşsal algı kadar farklı süreçleri etkileyebilir? Bu noktada otizmin nörolojik yönü daha derin olarak araştırılmalıdır. Otizmde GABAerjik yol önemli bir yere sahiptir fakat yolun hangi bölümünün atipik olabileceği belirsizliğini korumaktadır [71]. ASD'deki değişmiş nörogelişim ve değişmiş nörofizyoloji hakkındaki temel sorular – ne zaman, nerede ve hangi hücre tiplerinde meydana geldiği de dâhil olmak üzere – tam olarak çözülmemiştir. Geçmiş analizler, ASD genlerinin iki ana fonksiyonel grubunu tanımlamıştır: kromatin düzenleyiciler ve transkripsiyon faktörleri dâhil olmak üzere gen ekspresyon düzenlemesinde (GER) yer alanlar ve sinaptik fonksiyon dâhil nöronal iletişimde (NC) yer alanlar. İnsan korteksinden elde edilen tek hücreli gen ekspresyonu verileri, ASD riskinde hem uyarıcı hem de engelleyici soylarda orta-geç fetal gelişim ve olgunlaşan ve olgun nöronları içerir. GER ASD genlerinin, beynin belirli bölgelerindeki uyarıcı ve engelleyici nöronların sayısını değiştirerek uyarıcı-inhibitör dengesini etkilediği düşünülebilir. ASD, bu

çeşitli nörobiyolojik yörüngeler arasındaki fenotipik yakınsama ile ortaya çıkıyor olabilir [72].

Glial hücreler, sinaptik fonksiyon için gerekli kimyasalları koruyan, nöral aksonları izole eden miyelin üreten, beyin omurilik sıvısını sentezleyen, iltihabı kontrol eden ve atık ürünleri ortadan kaldıran bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Glial hücreler, sinirlerdeki elektriksel uyarı iletimine veya aksonlar ile dendritler arasındaki sinaptik etkileşimlere doğrudan katılmazlar, ancak sinirsel sinyal geçişinin hızını etkilerler. Glia'nın potansiyel rolleri derinlemesine incelendiğinde otizmin temel biyomoleküler özelliklerine dair çeşitli bilgiler ortaya çıkarılmaktadır. Nörogenez/miyelinizasyonda baskılanmış IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü 1) gibi yenidoğanın erken döneminde ortaya çıkan biyokimyasal eksikliklerle ilgili bulgular birçok laboratuvarıda vurgulanmaktadır. IGF 1'in neo-nöron miyelinasyonu ile fonksiyonel ilişkisi bu noktada büyük öneme sahiptir [50].

Otizm spektrum bozukluğunun altında yatan biyolojik mekanizmalara ilişkin birleştirici bir kanıt; sinaptik disfonksiyona neden olan, nöroligin 4 ( NLGN4X ) ve nöroligin 3 (NLGN3) gibi sinaptik moleküllerdeki nadir mutasyonların bulgularından gelmiştir [73].

Fosfoinosititler, lipit membranların temel bileşenlerindendir; sinyal iletimi, vezikül trafiği, membran kimliğinin belirlenmesi, membran reseptör lokalizasyonu ve aktivitesi dâhil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonun önemli düzenleyicileridir. Düzenlenmiş fosfoinositit metabolizması, hücresel fonksiyon için çok önemlidir. Bu işlevler, fosfoinosititlerin dinamik ve yüksek düzeyde düzenlenmiş metabolizmasına bağlıdır ve spesifik fosfoinositid kinazların ve fosfatazların iyi dengelenmiş aktivitesini gerektirir. Genetik ve fonksiyonel çalışmalardan elde edilen bulgular ve artan kanıtlar, bu enzimlerin otizmde sıklıkla düzensiz veya mutasyona uğramış olduğunu göstermektedir; özellikle fosfoinositid 3-kinazlar ve bunların düzenleyici alt birimlerinin sıklıkla etkilendiği görülmektedir [74, 75]. Otizmin etiyolojisinin IGF1/IGFR/IRS1/PI3K/AKT/mTOR hücre içi sinyal yolağı bozukluklarıyla ilişkili olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Özellikle bu kanal, miyelogenezi desteklemek için IGF-1'in çevirisini etkiler. Hücre dışı ve hücre içi ortam arasındaki bağlantı olan IGFR'nin tirozin kinaz reseptör bölgelerinin aktivasyonu, vazomotor ve metabolik etkileri indükleyen bir dizi sinyal yolunu etkiler [50, 76].

Mitokondri hücrede enerji üreten organeldir. Mitokondri, memeli hücrelerinde kendi genomuna sahip tek organeldir. Elektron taşıma zinciri (ETZ), hem mitokondriyal DNA (mtDNA) hem de nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanır. Mitokondriyal disfonksiyon, çeşitli psikiyatrik ve nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir ve otizm de bunlardan biridir. ETZ, reaktif oksijen türlerinin (ROS) baskın kaynağı ve ana hedefidir ve mitokondriyal spesifik süperoksit dismutaz ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar tarafından ROS'un neden olduğu hasardan korunur. Memeli beyin hücreleri oksidatif strese karşı çok hassastır (örneğin, ROS'un neden olduğu hasar). Beyindeki yüksek oksijen iletimi ve tüketimi, ROS üretmek için gerekli oksijen moleküllerini sağlar. Mitokondriyal disfonksiyonun otizmin gelişimi ile nasıl ilişkili olabileceğini daha iyi anlamak ayrıca antioksidanlar ve mitokondrial kofaktörler ile olası potansiyel otizm tedavilerine katkı sağlamak için alanda yeni araştırmalara ihtiyaç vardır [77, 78].

#### Fetal ortam, prenatal /postnatal çeşitli etmenler

Otizmin etiolojisinde fetal ortam önemli bir yere sahiptir örneğin Seks steroidleri, maternal enfeksiyonlar, immün aktivasyon, obezite, diyabet, hipertansiyon, ultrason muayeneleri, perinatal ve obstetrik olaylar (örn. Hipoksi), ilaç tedavisi gibi. Bu faktörlerin çoğu kritik zaman aralıklarındaki gen transkripsiyonu ve ekspresyonu üzerine etki eğilimindedir ve fetal-maternal-plasental sistemi tehlikeye atma potansiyeline sahiptir. Hem akut hem de sistemik kronik inflamasyon (SCI) tarafından tetiklenen maternal immün aktivasyonun (MIA), nörogelişimsel bozuklukların patogenezinde yer alan mekanizmalardan biri olduğu öngörülmektedir. Ebeveynde görülen SCI epigenetik değişiklikler yoluyla bir “DNA enflamatuar imzası” olarak yavrulara aktarılabilir. Epidemiyolojik kanıtlar, otizm için bir risk faktörü olarak maternal enfeksiyonu işaret etmektedir, 1964’de kızamıkçık salgınına maruz kalan popüasyonlardaki otizm insidansının artışıda bunun ilk göstergelerindendir. Hamilelik sırasında enfeksiyon, maternal bağışıklık sistemini harekete geçirir, sitokin sinyalini tetikler, plasentadan geçer ve muhtemelen gelişmekte olan fetal beyinde çok sayıda olumsuz nöral etkiye neden olur. Ayrıca şiddetli maternal obezitenin ve yüksek yağlı beslenmenin; düşük dereceli nöroinflamasyon, artmış oksidatif stres, insülin direnci, glukoz ve leptin sinyalleme, düzensiz serotonerjik ve dopaminerjik sinyal verme, sinaptik plastisitedeki karışıklıklar ve değişen süreçler yoluyla fetal nörogelişimi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Gebelik sırasındaki hipertansiyon, hem annenin hem de çocuğunun perinatal morbidite ve mortalitesine önemli ölçüde katkıda bulunur, potansiyel olarak fetal

gelişimi değiştirebilir ve yavrularda uzun vadeli vasküler, bilişsel ve psikiyatrik sonuç riskini artırabilir [58, 79-84].

Anne baba yaşı nörogelişimsel bozukluklar da önemli bir yere sahiptir ve ASD’de bir risk faktörü olarak görülmektedir. Çeşitli ilaçların kullanımı anormal motor gelişim, dil gelişimi ya da sosyal gelişimde gerilikler ve otizm ile ilişkilendirilmektedir. Prenatal valproat maruziyeti ile ASD arasındaki ilişki üzerine yapılan incelemeler, valproat maruziyetinin nörogelişim üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğunu ve ASD geliştirme riski ile ilişkili olduğunu bulmuştur [68, 85-88]. Valproik asit (VPA) veya 2-propilpentanoik asit, klinik olarak epilepsi için bir tedavi ve bipolar bozuklukta bir duygudurum düzenleyici olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Gebelikte valproik asit kullanımı, doğuştan malformasyonlar, gelişimsel gecikme ve bilişsel işlev bozukluğu dâhil olmak üzere çocuk için çok sayıda risk oluşturmaktadır. Hayvan modelleri; valproata maruz kalmanın hem kısa hem de uzun vadeli nörogelişimsel yörüngeleri etkilediğini, embriyonik gelişim sırasında kritik noktalarda nöral göç yollarına müdahale ettiğini ve potansiyel olarak nöral tüp defektlerine katkıda bulunduğunu göstermektedir [58, 89, 90].

#### **2.2.4 Otizm ve hayvan çalışma modelleri**

Otizmin patojenik mekanizması henüz net olarak açıklanamamıştır, henüz spesifik bir tedavisi mevcut değildir ve biyobelirteç ihtiyacı vardır [53]. Bu yüzden genetik, nöral ve farmakolojik manipülasyonlar ile ASD araştırmalarında hayvan çalışmaları gereklidir. Hayvan çalışmaları, insan çalışmalarından farklı olarak, hastalığın patogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin rolünün kısıtlanmasını, bununla birlikte ASD’de değişen beyin fonksiyonu ve davranış arasındaki ilişkilerin çözülmesini mümkün kılar [14].

ASD bozuklukları için belirlenen hayvan modelleri bir veya birkaç otizm belirtisi göstermektedir (bilişsel, sosyal etkileşim ve nitel iletişim alanlarında bozukluklar şeklinde). Örneğin VPA’ya doğum öncesi maruz kalan sıçanlar, sosyal alanda çok çeşitli farklılıklar gösterir. Bebeklik döneminde sosyal iletişimde eksiklikler gösterirler, yuvadan çıkarıldıklarında anneleri ve kardeşleriyle düzgün bir şekilde iletişim kuramazlar ve nötr bir koku ile kendi yuva kokularını ayırt edemezler. Otizmli hayvan modelleri oluşturulurken ilgili simülasyonlar ya genetik mühendisliği teknikleri (nakavt sıçanları ve fareler) ya da belirli çevresel faktörlerin erken (doğum öncesi ya da doğum sonrası) etkileri kullanılarak



gerçekleştirilir. Model hayvanların davranışsal durumlarını değerlendirmek için davranış deney yöntemleri kullanılmaktadır. Bunların bir kısmı “klasik” (ör. Açık alan testi, Morris su labirenti, T benzeri labirent ve radyal labirent) diğerleri ise otizm modelleri için özel olarak tasarlanmıştır [91, 92].

Fare modelleri, normal beyin gelişiminin altında yatan hücresel ve moleküler süreçlerin yanı sıra genetik varyasyonun (örneğin, polimorfizmler, mutasyonlar, silinmeler ve kopya sayısı varyantları) ve toksik ajanlara maruz kalmanın merkezi sinir sisteminin gelişimini nasıl değiştirebileceğini anlamak için önemli araçlar haline gelmiştir. Fare modeli sistemleri, otizmin etiyojisine mekanik bir bakış sağlamak için uzun süredir kullanılmaktadır ve insan hastalıkları için farmakolojik tedavilerin keşfedilmesinde etkili olmuştur [93].

Otizm için genetik ve genetik olmayan hayvan modelleri mevcuttur. Çoğu çalışma otizmi indüklemek için gebelikte veya doğum sonrası dönemde valproik asit (VPA) kullanır, beyin gelişiminin farklı aşamalarında VPA'ya maruz kalma otizm benzeri davranışları tetikler [91]. Ayrıca genel kabul gören otizm modelleri arasında; patolojik üreme ile oluşturulan modeller, stres modelleri, genetik modeller, gen nakavt modeller, propiyonik asit modeli, otizm ile ilişkili beyin zonlarına müdahale ile oluşturulan modeller ( cerebellum, amigdala, medial prefrontal korteks gibi), inflamasyon modelleri (Ör; maternal IL 17a yolu veya nörotoksin yükleme gibi, maternal immün aktivasyon=MIA modeli), rahimde lipopolisakkarit (LPS) maruziyeti ile oluşturulan deneysel otizm modelleri yer almaktadır [15, 93, 94]. CRISPR yöntemi ile elde edilen otizm benzeri davranışlar sergileyen hayvan modelleri mevcuttur [95]. Başlangıçta insülin direnci, diyabet kaynaklı nefropati ve feniloketonüri üzerine çalışmalar için yetiştirilen BTBR T + Itpr3 tf / J farelerin (BTBR), güçlü ve tutarlı otizmle ilgili davranışlar sergilediği tespit edilmiştir, otizm alanında tercih edilen BTBR fare modelleri; korpus kallosumun ve hipokampal komissürün ciddi şekilde azaltılması ile elde edilmektedir [96, 97].

Model hayvanların davranışsal durumlarını değerlendirmek için davranış deney yöntemleri kullanılmaktadır [98].

### 2.2.5 Vagal sinir stimulasyonu ve otizm

Otizm için her ne kadar tam bir tedavi bulunamasa da belirtilerinin pozitif yönde azalmasına neden olan girişimsel çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri de “vagal stimulasyon”dur [13].

Vagus siniri (kraniyal sinir [CN] X), hem afferent hem de efferent bakımdan hem motor hem de duysal fonksiyonları içeren vücuttaki en uzun kraniyal sinirdir. Bilateral olarak beyin sapında başlayan ve boyun, toraks ve karın içinde yaygın olarak kıvrılarak ve döngüler yapan 10. kranial sinirdir [99]. Vagus siniri medulla oblongata'da kökenlidir ve kafatasından juguler foramen yoluyla çıkar [99, 100]. Miyelinli A ve B liflerinin yanı sıra miyelinsiz C liflerinden oluşur. Vagus sinirinin en önemli işlevi, beyne bağırsak, karaciğer, kalp ve akciğerler gibi iç organlarla ilgili bilgileri getiren afferenttir. CN X'in işlevleri arasında, kalp, farenks, dil ve gastrointestinal sistem gibi vücudun çeşitli organ sistemlerini içeren motor, duysal, tat ve kemoreepsiyon işlevleri yer alır. Bu şekilde vücudun otonom sinir sisteminin birçok fonksiyonuna dâhil olduğu gözlenmektedir [101, 102].

Boyunda vagus siniri, yutma ve seslendirmeden sorumlu olan farenks ve gırtlak kaslarının çoğuna gerekli innervasyonu sağlar. Toraksta, kalbe ana parasempatik kaynağı sağlar ve kalp atış hızında bir azalmayı uyarır. Bağırsaklarda vagus siniri düz kasların kasılmasını ve glandüler sekresyonu düzenler. Vagal efferent liflerin preganglionik nöronları, medullada bulunan vagus sinirinin dorsal motor çekirdeğinden ortaya çıkar ve hem lamina propriada hem de muskularis eksternada bağırsağın kas ve mukozal katmanlarını innerve eder [100, 103].

Vagus siniri, kalp atış hızını, gastrointestinal motilite ve sekresyonu, pankreas endokrin ve ekzokrin sekresyonunu, hepatik glikoz üretimini ve diğer viseral fonksiyonları kontrol ederek metabolik homeostazı düzenler. Ek olarak, vagus siniri, patojen istilası ve doku hasarı sırasında doğuştan gelen immün tepkileri ve enflamasyonu kontrol eden nöral refleks mekanizmasının (inflamatuvar refleks) ana bileşenidir [104, 105].

Vagus sinir stimülasyonu (VNS), epilepsi ve diğer nörolojik durumların tedavisinde rutin olarak kullanılan tıbbi bir tedavidir. Vagus sinir stimülasyonunun tedaviye dirençli depresyon, travma sonrası stres bozukluğu ve inflamatuvar bağırsak hastalığı için ümit verici bir ek tedavi olduğuna dair ön kanıtlar vardır. Bu siniri hedef alan tedaviler vagal tonusu

artırır ve sitokin üretimini engeller. Vagus sinir stimülasyonu vagus sinirine elektriksel uyarılar uygulayarak çalışır. Vagus sinirinin uyarılması iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir: şu anda en sık kullanılan uygulama olan doğrudan invaziv bir uyarı ve dolaylı bir transkütanöz invazif olmayan uyarım. İnvazif VNS (iVNS), küçük bir puls üreticinin sol torasik bölgede subkutan olarak cerrahi implantasyonunu gerektirir [103]. Çok sayıda çalışma, VNS tedavisinin güvenli olduğunu ve yetişkinlerin yanı sıra 6 aylık kadar küçük çocuklara minimum yan etki ile verilebileceğini belgelemiştir [106, 107].

Bir dizi kanıt, VNS'nin otizmlili bireyler için bazı semptomatik rahatlamlar sağlayabileceğini göstermektedir. Pek çok otizmlili bireyde, parasempatik sistem düzensizdir ve sıklıkla azalmış vagal tonus gözlenir. Azalmış vagal aktivite hem otistik davranışlar hem de dil bozukluğu ile ilişkilendirilmektedir. Hem epilepsi hem de otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda VNS kullanan çalışmalar olumlu sonuçlar vermiştir. VNS, otizmlili bireylerde nöbet sıklığını azaltır ve yaşam kalitesini iyileştirir [107, 108].

### 2.2.6 Otizm ve sitokinler

Sitokinler, metabolizma, iltihaplanma ve kan basıncı dâhil olmak üzere çok sayıda biyolojik ve fizyolojik süreci kontrol etmede kritik olan, bağışıklık sisteminin işlevlerini düzenleyen glikoproteinlerdir. Pro- ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengedeki değişiklikler, sayısız inflammatuar hastalığa yol açan yıkıcı sonuçlara yol açabilir. Sitokinler, mikroorganizmalara karşı konakçı savunmasında önemli bir rol oynar. Koruyucu lokal inflamasyonu ve sistemik akut faz tepkilerini indükleyerek doğuştan gelen bağışıklığı düzenlerler. Ayrıca adaptif bağışıklığın başlatılmasında, güçlendirilmesinde ve düzenlenmesinde önemlidirler. Sitokinler, metabolizma, iltihaplanma ve kan basıncı dâhil olmak üzere çok sayıda biyolojik ve fizyolojik süreci kontrol etmede kritik öneme sahiptir. Hücresel, doku ve organizma düzeyinde homeostazı sürdürmek için gerekli dengeyi sağlarlar. [109, 110].

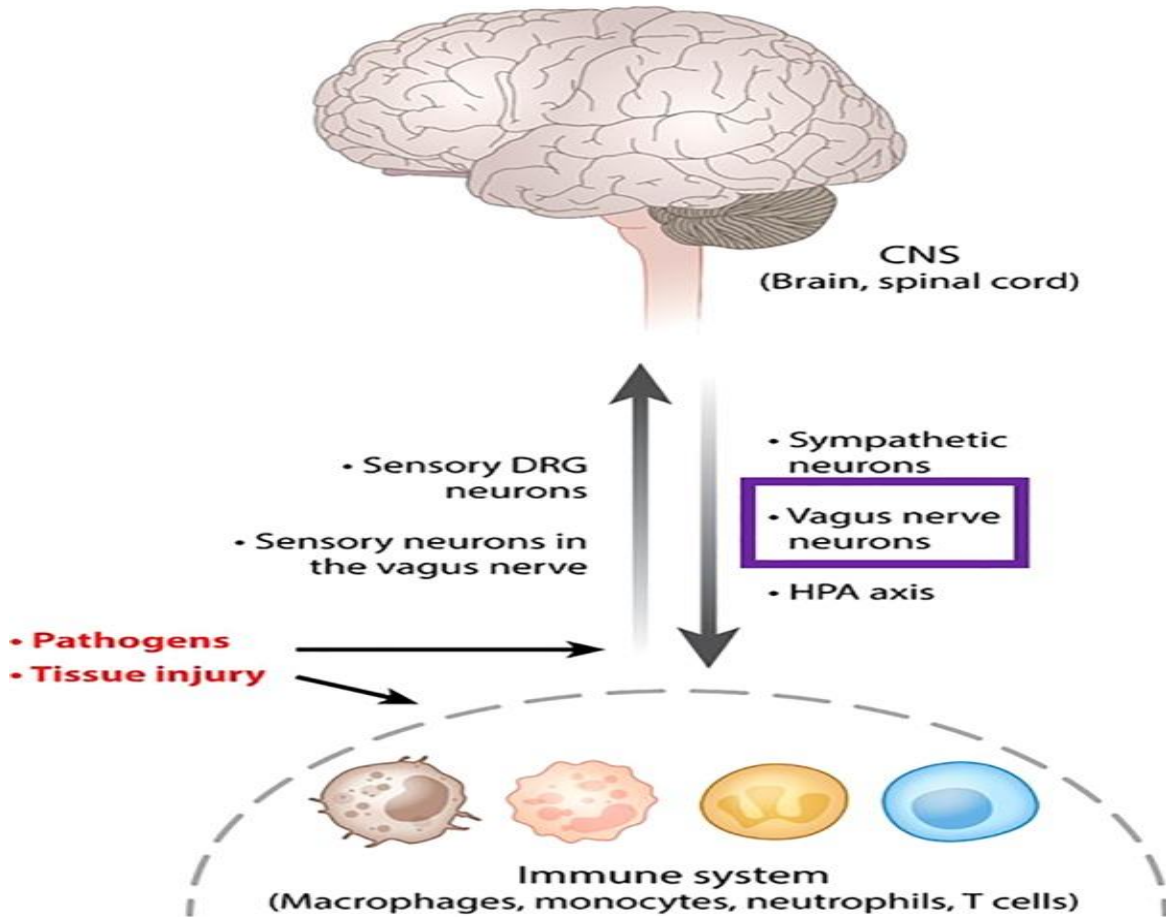
Sitokinler çok farklı hücreler tarafından üretilibilmeleri ve birçok farklı hücreyi etkileyebilmeleri nedeniyle, fonksiyonlarına veya kaynağına göre farklı kategoriler halinde sınıflandırılabilir. Lökositlere etki eden sitokinlere interlekin adı verilir. Bunlar, lökositleri uyararak farklılaşmalarını ve çoğalmalarını sağlarlar. Lökositler doğuştan gelen sitokin yanıtlarının ana kaynağı olmasına rağmen, parankimal hücrelerin aynı zamanda doğuştan

gelen inflamatuvar sitokinler ürettiği ve konak savunması oluşturmada sitokin yanıtlarını optimize etmek için lökositlerle etkileşime girdiği giderek daha fazla kabul edilmektedir. Lenfositler tarafından sentezlenen sitokinlere Lenfokin, monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen sitokinlere Monokin denilmektedir. Bazı kaynaklarda lenfokin ve monokin terimleri çıkartılmış, ana işleviyle tanımlanan IL terimi benimsenmiştir. Sitokinler fonksiyonlarına göre; interferonlar, tümör nekroz faktör (TNF), kemokinler olarak sınıflandırılabilir. Birçok konvansiyonel immünomodülatör ilaç, terapötik etkilerini, en azından kısmen, zararlı sitokinlerin etkilerini azaltarak indükler. Bu ilaçlar glukokortikoidleri içerir. Hedefleri, inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu indükleyen transkripsiyon faktörleri, nükleer faktör ve aktivatör protein 1'i içerir. Biyolojik tedavilerin klinik etkinlik gösterdiği sitokinler; TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-2, IL-12, IL-23, IL-17A, IL-10 şeklinde gruplanabilir [109].

Mevcut veriler sitokin değişiklikleri ile otizm arasında olası bir ilişkiye işaret etmektedir. Bununla birlikte, otizmdeki nöroimmünolojik faktörlerin sistematik araştırmalarına ihtiyaç vardır [111]. Sitokinler, konakçı immün tepkisini koordine eder ve ayrıca merkezi sinir sistemi (CNS) de dâhil olmak üzere immün ve immün olmayan kökenli hücreler arasındaki normal sinyalleme aracılığı eder. Gelişmekte olan CNS içindeki hücreler, otokrin ve parakrin sinyalleme için sitokinleri kullanır, sitokinlerin çoğu aynı zamanda immün modülatör olarak görev yaptığından, normal sitokin aracılı gelişimsel süreçler sitokin dengesizlikleri tarafından bozulmaya karşı hassastır.

Nöroimmün iletişim sistemindeki anahtar devre, efferent vagus sinir lifleri ve kolinerjik sinyal ile sağlanır. Devam eden araştırmalar, nöroimmün iletişimin, bağışıklık ve inflamasyonun sinirsel düzenlenmesinin organize ve entegre bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır [112]. Nöroimmün iletişimdeki sinir devreleri, sinir sisteminin kardiyovasküler, gastrointestinal (GI), solunum ve diğer fizyolojik fonksiyonları düzenlediğine benzer bir şekilde bağışıklık fonksiyonunu düzenler. Nöroimmün iletişimdeki önemli bir nöroimmünomodülatör devre vagus siniri temelli “inflamatuvar refleks”tir. Periferik sitokin seviyelerinde ve diğer inflamatuvar moleküllerde değişiklikler afferent vagus siniri periferik uçları tarafından tespit edilir ve beyin sapı çekirdeği tractus solitarius (NTS) ile iletilir. NTS anatomik ve fonksiyonel olarak periferik immün yanıtları ve sitokin salınımını düzenleyen efferent (motor) vagus sinir nöronlarının ana kaynağı olan vagusun dorsal motor çekirdeği (DMN) ile bağlantılıdır [104].

Vagus siniri, metabolik homeostazın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir ve efferent vagus siniri aracılı kolinerjik sinyal verme, immün fonksiyonu ve inflamatuvar refleks yoluyla proinflamatuvar yanıtları kontrol eder [103].



Şekil 2.1. Merkezi sinir sistemi (CNS) ve bağışıklık sistemi (Immune system) arasındaki iletişim [117]. (Sinir sistemi ve bağışıklık sistemi; patojen istilasına, doku hasarına ve diğer homeostatik tehditlere yanıt olarak iletişim kurar. Makrofajlar, nötrofiller, monositler, T lenfositler ve diğer bağışıklık hücreleri, patojen bileşenlerinin ve doku hasarı moleküllerinin varlığını tespit eder ve sitokinleri ve diğer sinyal moleküllerini serbest bırakır. Periferik immün homeostazdaki bu değişiklikler, dorsal kök ganglionlarında (DRG) bulunan duyu nöronları ve omuriliğe ve beyne sinyal gönderen vagus siniri afferent nöronları tarafından tespit edilir. Patojenler ayrıca doğrudan afferent nöronları aktive eder. Bu sinyaller, katekolaminler ve ACh salınımı ile sempatik ve efferent vagus sinir lifleri (mor kutu) yoluyla azalan sinyallerle merkezi sinir sistemine entegre edilir. Bu nörotransmitterler, bağışıklık hücreleri ile etkileşime girer ve bağışıklık hücresi işlevini ve tepkilerini kontrol eder. Nöronlardan salınan diğer nörotransmitterler de bağışıklık kontrolünde rol oynar. Kortikosteroidlerin salınımı ile hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) eksenini ayrıca beyinden bağışıklık düzenlemesine bir kanal sağlar.)

### 2.2.7 Otizm ve biyobelirteç arayışı

Klinik araştırmalarda, 'biyobelirteç' veya 'biyolojik belirteç' terimi, doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülebilen ve hastalığın insidansını ve sonucunu tahmin edebilen geniş bir tıbbi işaret kategorisini veya tıbbi durumun nesnel göstergelerini ifade eder. Bir biyobelirteç geliştirilebilmesi için, belirtecın semptomların başlangıcından önce mevcut olduğunun ve hastalığa özgü olduğunun gösterilmesi gerekir. Ölçülebilir biyolojik süreçler ve klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi anlamak, tüm hastalıklar için tedavi olanaklarımızı genişletmek ve normal, sağlıklı fizyoloji anlayışımızı derinleştirmek için hayati önem taşımaktadır. Bir biyobelirteç için üç potansiyel kullanım vardır;

- 1) Genetik çalışmalarda bir bozukluğun homojen alt tiplerini tanımlamak için güvenilir bir fenotip,
- 2) Zor vakalarda tanıyı destekleyebilen sorunların gerçek olduğunu gösteren ve özel bir tedaviye duyulan ihtiyacı doğrulayan klinik tanının güvenilirliğini artırmak,
- 3) Bir bozukluk geliştirme riskini belirlemede bebekler ve çocuklar için güvenilir bir tarama aracı.

Testlerin duyarlılıkları, özgüllükleri ve pozitif tahmin değerleri çok önemlidir. Nörogelişimsel bozuklukları olan çocuklar, erken müdahale ve tedavilerden en çok fayda sağlayan gruplardır. Objektif tanıya yardımcı olmak için biyobelirteçlerin geliştirilmesi ve doğrulanması, bu klinik amaç için önemlidir. Otizm taraması için geliştirilecek bir biyobelirtecın geçerlilik testlerinden de geçmesi gerekir. Bu geçerlilik testleri şunları içerir:

- 1) Biyobelirteç semptomların başlamasından önce mevcut mu?
- 2) Biyobelirteç hastalığa özgü mü?
- 3) Biyobelirteç, bozukluğu tanı koymak için kullanılan davranışsal semptomlardan bağımsız olarak mı tanımlıyor?

Otizmde erken tarama için herhangi bir başarılı biyobelirteç testi, otizm semptomlarının varlığından önce gelmeli, otizme özgü olmalı ve yanlış pozitifleri sınırlamalı ve ayrıca bozukluğu teşhis etmek için şu anda kullanılan davranışsal önlemlerden bağımsız olmalıdır [113-115].

Otizm spektrum bozukluğu, 68 çocuktan 1'ini etkileyen heterojen bir durumdur. Tanı, yaşamın ikinci yılında ortaya çıkan ve bu nedenle tipik olarak 3 ila 4 yaşına kadar yapılmayan karakteristik davranış bozukluklarının varlığına dayanır. Yaşamın ilk 2 yılındaki davranışsal işaretler, daha sonraki bir otizm teşhisini doğru bir şekilde tahmin etmek için yetersiz kalmıştır. Yeni bulgular, yaşamın ilk yılındaki erken beyin görüntülemenin, ASD'nin presemptomatik tahmini için büyük umut vaat ettiğini göstermektedir. Otizmin beyin temelli potansiyel biyobelirteçleri arasında; Yapısal Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), dinlenme durumunda fonksiyonel emar (MRI), çok modlu MR gibi beyin görüntüleme yöntemleri yer almaktadır. ASD'de beyin gelişimi üzerine yapılan erken çalışmalardan elde edilen en tutarlı bulgulardan biri, doğumda kafa boyutunun normal olduğu, ancak 2 ila 3 yaşına kadar beyin boyutunun önemli ölçüde büyüdüğü olmuştur [113]. Son zamanlarda yapılan iki çalışma, daha sonra ASD tanısı konan bebeklerde yaşamın ilk yılında başka bir beyin anomalisi saptamıştır; İlk çalışmada, daha sonra ASD geliştiren bebeklerde beynin kortikal yüzeyini çevreleyen subaraknoid boşlukta aşırı miktarda beyin omurilik sıvısı (BOS) bulunmuştur ( "ekstra eksenel BOS" ) [116]. İkinci çalışmada, daha sonra ASD geliştiren bebeklerde 6 ayda kontrol gruplarına göre %18 daha fazla ekstra eksenel BOS ( EA-CSF) belirlenmiştir [117]. Ayrıca Otizmlili bireylerde makrosefali, beyin ve beyincikte tutulumlar, serotonerjik nöronlarda etkilenmelerde gözlemlenen farklılıklar arasındadır [50]. Hem mikroglia hem de astrositler, beyin değişikliklerine hızla uyum sağlamak için morfolojilerini değiştirir; birbirini bir dizi sinyalle etkiler. Bu mekanizmalar normal gelişim için kritik öneme sahiptir ve hatta gelişimin erken evrelerinde hafif bir dengesizlik, doğum öncesi dönemde yoğun mikroglial proliferasyon ve aktivite, sonrasında bozulma ile birlikte homeostaz kaybına yol açabilir. Sinaptik fonksiyonlarda bozulmanın, genel kronik nöroinflamasyonda bozulmanın ve proinflamatuvar ajanların anormal ve zararlı üretiminin ASD patogenezinde anahtar rolü olduğu düşünülmektedir [118].

Otizmden etkilenen birçok bireyde kromozomal anormallikler, delesyonlar veya duplikasyonlar, tek gen bozuklukları veya varyantları tesbit edilmektedir bu nedenle genomik çalışmaları otizm biyobelirteç arayışında önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte, birçok hastada, potansiyel olarak ASD biyobelirteçleri olarak kullanılabilecek biyoakışkan metabolom ve proteom profilleri tanımlanarak bir dizi metabolik anormallik vurgulanmıştır. Proteomik ve metabolomik dâhil olmak üzere yeni nesil dizileme ve diğer omik platformları, spesifik genomik ve diğer omik bulgulara bağlı olarak hastadan hastaya değişebilen yeni tanı

araçlarına ve tedavi hedeflerine yol açabilecek, erken yaşta hastalığı teşhis edebilecek biyobelirteçler için umut 26adetmektedir. Hasta genetik ve klinik verileri ayrıca mikrobiyota dâhil çevresel faktörlerle birlikte biyobelirteç adayları olan yeni proteinlerin ve metabolitlerin aşamalı olarak tanımlanması, kişiselleştirilmiş tıp için makine modellerinin gelişimini ve yapay zekâ tarafından gerçekleştirilen klinik karar destek sistemlerini getirecektir [119].

Otizmin altında yatan hastalık mekanizmaları ve ilişkili tıbbi, nörolojik ve psikiyatrik komorbiditeler henüz yeterince aydınlatılmadığı için şu anda davranışsal kriterlere göre teşhis edilmektedir. Tanı yöntemleri ve tarama araçları biraz öznel ve küçük çocuklarda değerlendirilmesi zordur. Erken teşhis kritiktir çünkü davranışlar üzerine terapi müdahalesi ne kadar erken başlarsa erken müdahalenin faydaları tipik olarak o kadar artar. ASD riskini tahmin edebilen, erken teşhise yardımcı olabilen ve hatta potansiyel terapötik hedefleri tanımlayabilen bir biyolojik belirtecin keşfi, büyük klinik öneme sahiptir [120]. Otizm alanında yapılan araştırmalara göre biyobelirteçler birkaç ana tipe ayrılmaktadır; Davranışsal, Genetik, Biyokimyasal, Bağışıklık, Tıbbi Öykü- Prenatal belirteçler (Aile Öyküsü, Gebelik Komplikasyonları), Metabolik, Nörogörüntüleme, Nörofizyoloji, Besinsel gibi. ASD için birçok umut verici biyobelirteç araştırması gerçekleştirilmektedir. Yine de, birçok biyobelirteç başlangıç niteliğindedir, tekrar tekrar doğrulanmaları, büyük örneklemelerde kanıtlanmaları ve otizmin tanı ve tedavisindeki rollerinin gösterilmesi gerekir [121].

### Serotonin

Otizmde tanımlanan ilk biyobelirteç, 50 yıl önce tanımlanan yüksek tam kan 5-HT (elevated platelet serotonin=yüksek trombosit serotonin) veya hiper-serotonemidir [122]. Amino asit triptofandan biyosentezlenen serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), esas olarak serotonerjik nöronlarda, enterokromaffin hücrelerinde ve kan trombositlerinde bulunur. 5-HT, merkezi sinir sistemindeki (CNS) bir dizi nörobiyolojik süreci kontrol eden çok önemli bir hormon ve nörotransmitterdir. Bu süreçlere 7 alt ailede sınıflandırılan bir grup serotonin reseptörü aracılık eder. Bir nörotransmitter olarak serotonin, erken nörogelişimsel aşamada çok önemli bir rol oynar. Özellikle 5-HT'nin nörit büyümesi, dendritik omurga morfolojisi, nöronal devreleri şekillendirme, sinaptik iletim ve sinaptik plastisite gibi önemli rolleri vardır [123]. Serotonin veya 5-HT, nörotransmisyon, vasküler ton, hemostaz, kemik rezorpsiyonu, GI



işlevi ve hücrel proliferasyon dâhil olmak üzere çeşitli işlevlere atfedilen pek çok yerde bulunan bir sinyal molekülüdür. 5-HT, triptofan hidroksilaz (TPH) ve ardından L-amino asit dekarboksilaz içeren 2 aşamalı bir enzimatik işlemle triptofandan türetilir, triptofan hidroksilaz-2 CNS serotonini için hız sınırlayıcı enzimdir, triptofan hidroksilaz 1 ise enzimin periferik izoformunu kodlar [124, 125]. Serotonin kan-beyin bariyerini geçmez ve bu nedenle beyin serotonini yalnızca merkezi sinir sisteminde (CNS) sentezlenir. Orada monoamin oksidaz A tarafından katabolize edilir ve ürün kana salgılanır. Serotonerjik sistem, memeli embriyosunda en erken gelişen ve aynı zamanda en yaygın olarak dağıtılan sistemlerden biridir. Nöronların çoğu medyan ve dorsal rafe çekirdeklerinde bulunur. Birincisi esas olarak kortekse ve ikincisi hipokampusu lif sağlar. Serotonerjik sistem beynin neredeyse tüm alanlarını innerve ederken, serotonin gelişimsel bir sinyal olarak hareket ettiği serotonerjik olmayan hücrelerde de bulunur. Serotonerjik nöronlar insan beyinde 5. Gebelik haftasından itibaren saptanabilir ve sonraki aylarda hızla büyür ve çoğalırlar [126]. Serotonin reseptörleri otizm spektrum bozukluğunda terepötik hedefler arasında yer almaktadır. Serotonin reseptörleri için oldukça seçici bir dizi ligandın geliştirilmesinin muhtemel ASD tedavilerinin keşfi için yeni fırsatlar sağlayacağına inanılmaktadır [123]. Otizmde seçici serotonin inhibitörlerinin kullanımı şu anda yoğun bir araştırma altındayken, bir başka alternatif gelişimsel müdahale olan 5-Hidroksitriptofan'ın erken uygulanması, potansiyel olarak umut verici bir seçenek olarak önerilmektedir. Bununla birlikte, herhangi bir insan çalışması başlatılmadan önce, büyük ölçüde hayvanlar üzerinde ve özellikle otizm hayvan modellerinde denenmesi gerekir [126].

### Melatonin

Otizmde biyokimyasal biyobelirteç araştırmaları ele alındığında; daha düşük melatonin salgılanması/atılımı önemli bir yere sahiptir. Melatonin esas olarak epifiz bezinde üretilen bir hormondur, üretimi belirgin bir sirkadiyen ritme sahiptir ve kanda seviyeleri tipik olarak gece 2 civarında zirve yapar. İnsanlarda bu günlük ritim genellikle 3-4 aylıkken mevcuttur. Melatonin ayrıca bağırsak duvarında ve plasentada da üretilir. Melatonin uyku gecikmesini azaltır, bioritmileri güçlendirir, güçlü bir antioksidandır, nörogelişim ve plastisitede rolü vardır ve plasental homeostazda önemlidir. Otizmde melatonine ilk ilgi, esas olarak uykudaki rolünden ve otizmle ilişkili uyku sorunları için bir tedavi olarak potansiyel kullanımından ve belki de serotonin ile olan yakın metabolik ilişkisinden gelmektedir. Melatonin, L-triptofandan birkaç metabolik ara ürün, özellikle de serotonin yoluyla

sentezlenir [127, 128]. Birçok çalışma otizmde; özellikle gece melatonin salgılanması ve metabolitlerinin atılımında azalma, melatonin sirkadiyen ritimlerinde değişiklikler gibi melatonin salgılanmasında anormallikler bildirmiştir [129]. Melatonin nörogelişimdeki belirgin rolü ile de otizm araştırmalarında ilgi çekicidir. Melatonin hücre içi süreçleri (örn; G-proteinleri) ve ikinci habercilerin (örn; cAMP, IP3, Ca<sup>2+</sup>) aktivitesini düzenleyebilir. Nörogelişim sırasında, melatonin tarafından düzenlenen bu aktiviteler, gen ekspresyonunun düzenlenmesi için hücre içi sinyalleşmede önemli bir role sahiptir. Otizmde terapötik yeni bakış açıları geliştirmek için öncelikle sirkadiyen ritimler gibi bazı temel düzenli fizyolojik ritimleri eski haline getirmek gerekir. Bu nedenle, melatonin önemli bir potansiyele sahiptir [130].

### Oksidatif stres ve glutatyon

Oksidatif stres, pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) neden olduğu hücreye zarar verici bir etkiyle sonuçlanan bir dengesizlik olarak tanımlanabilir [131]. Redüksiyon-oksidasyon reaksiyonu ROS'un üretildiği hücrelerin hücresel fizyolojik sürecinde vazgeçilmez bir reaksiyon türüdür. ROS, normal fizyolojik süreçlerde hücrelerin antioksidan savunması ile elimine edilir ve vücut fizyolojik bir denge halindedir. Bununla birlikte, ROS üretiminde bir artış veya hücre antioksidan kapasitesinde bir azalma olursa bu denge bozulacak ve oksidatif strese neden olacaktır [132]. Pekçok makale, otizmde redoks durumunun değiştiğini veya oksidatif stresin arttığını bildirmiştir. Çalışmaların çoğu plazma glutatyon ölçümüne odaklanmıştır ve çoğu araştırmacı ASD'de daha düşük seviyelerde indirgenmiş glutatyon (GSH), daha yüksek oksitlenmiş glutatyon (GSSG) seviyeleri gözlemlemiştir ve glutatyon ile ilişkili anormallikler bildirmiştir. Glutatyon redoks dengesizliği, otizm spektrum bozukluğunda önemli bir faktördür [133]. Glutatyon; hücreleri serbest radikaller, peroksitler ve ağır metaller gibi reaktif oksijen türlerinin etkilerinden koruyan bir antioksidandır, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve hücre içi redoks yollarında dengenin korunmasında anahtar rol oynar. GSH, yani tripeptid gama Glutamil-Sisteinil-Glisin hücresel redoks dengesinde önemli bir rolü olan tek tiyol donanımlı peptittir ve tüm memeli hücrelerinde bol miktarda bulunur. Reaktif oksijen türleri, hücreler için toksik bir molekül olan hidrojen peroksit üretir. Mitokondri ve sitozolde glutatyon peroksidaz ve peroksizomlarda katalaz hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ortadan kaldırabilir. Bu işlev; sağlıklı gelişim gösteremeyen, mitokondriyal disfonksiyonu bulunan otizimli çocuklarda tehlikeye

girebilir ve oksidatif strese yol açar [134]. Otizmde en önemli komorbiditelerden biri epilepsidir, oksidatif stresin hem nöbet başlangıcında hem de epilepsinin ilerlemesinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar vardır. Oksidatif stresin otizimin patofizyolojisinde de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonu, inflamasyon, değişmiş bağışıklık tepkisi, azalmış DNA metilasyonu ve epigenetik düzensizlik gibi bir takım değişikliklere yol açar. Antioksidan durumunun erken değerlendirilmesi ve tedavisi, beyindeki oksidatif stresi daha fazla geri dönüşü olmayan beyin hasarına neden olmadan önce azaltılabileceğinden daha iyi bir prognoza neden olabilir [131, 135]. Merkezi sinir sistemi (CNS), sınırlı antioksidan kapasitesi, daha yüksek enerji gereksinimleri ve daha yüksek lipid/keton ve demir seviyeleri nedeniyle oksidatif strese karşı özellikle hassastır. Beyin vücut kütlesinin yaklaşık %2'sini oluşturur ancak vücudun metabolik oksijeninin %20'sini tüketir. Bu nedenle, nöronlar vücut enerjisinin orantısız olarak büyük bir bölümünü tüketir. Nöronların glutatyon üretim kapasitesinin olmaması nedeniyle, CNS'nin ROS'u detoksifiye etme kapasitesi sınırlıdır. Bu nedenle nöronlar, ROS'taki artıştan ve antioksidanların eksikliğinden etkilenen ilk hücrelerdir. Bu anlamda, nöronlar oksidatif strese en duyarlı hücrelerdir. Ayrıca, CNS gelişiminin erken kritik döneminde nöronal sağkalım için antioksidanlar gereklidir. Bu nedenle oksidatif stres birçok nörodavranışsal bozukluğun patolojisinde rol oynamaktadır [131].

### Oksitosin

Oksitosin, biyokimyasal olarak tanımlanan ve sentezlenen ilk nöropeptit hormondur; vücudun genel sağlığı, adaptasyon, gelişme, üreme ve sosyal davranış için geniş etkileri olan pleiotropik bir hormondur. Oksitosin, otonom sinir sistemini ve bağışıklık sistemini etkiler. Oksitosin-vazopressin sistemi, hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin yanı sıra asetilkolin, GABA, glutamat, opioidler, kanabinoidler, katekolaminler, indolaminler ve steroidlerle etkileşime girer. Nörohormon oksitosin (OT), hayvanlarda ve insanlarda sosyal öğrenme ve bağlılık davranışında rol oynar [136]. İnsanlarda, OT'nin görmeyi kolaylaştırdığı, biyolojik harekete aktivasyonu arttırdığı ve sosyal motivasyonu arttırdığı bildirilmiştir. Genetik çalışmalar, OXTR genindeki iki yaygın tek nükleotid polimorfizmi (SNP) varyantının, sosyal davranıştaki bireysel değişkenlik ile ilişkili olduğunu göstermiştir. İlk varyant rs2254298, otizm ve depresyon ile ilişkilendirilmiştir. OXTR, G proteinine bağlı bir reseptördür ve fosfolipaz C'ye pozitif olarak bağlıdır. Memelilerde, OXTR erken gelişim dönemlerinde daha yüksek seviyelerde ifade edilir ve davranışlarla ilgili beyin bölgelerinde

yoğunlaşır. Yapılan araştırmalarda OXTR nakavt farelerin, sosyal izolasyona tepki olarak daha az ultrasonik ses çıkarttığı ve daha agresif davranışlar gösterdiği belirlenmiştir [137, 138]. Çeşitli araştırmalarda OT reseptör geni OXTR'nin ASD ile ilişkili olduğu ve OXTR metilasyonunun derecesi ile canlılık algısı tarafından uyarılan beyin aktivitesi arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir [127]. Oksitosin ile tedavi, OSB'de ilaç tedavisi araştırmalarının en aktif alanlarından biridir. Klinik deneyler birkaç yolla yürütülmektedir örneğin; tek seferlik bir OT dozunun etkisinin incelenmesi veya uzun süreli OT tedavisinin etkisinin incelenmesi gibi [139].

#### Sitokinler, kemokinler ve bağışıklık sistemi

Son 10 yılda, ASD'ye katkıda bulunan inflamatuvar mekanizmalara işaret eden birçok kanıt birikmiştir ve bağışıklık düzensizliğinin beyin bağlantısı ve işlevini nasıl değiştirdiğini ayrıca otizm fenotiplerinde nasıl bir rol oynadığını tam olarak belirlemek için yoğun araştırmalar yapılmıştır [140]. Otizmde bağışıklık sistemindeki değişiklikler, BOS ve kanda yüksek pro-inflamatuvar sitokin profilleri, beyne özgü oto-antikorların artan varlığı, otizmlili çocukların annelerinde bağışıklıkla ilgili sorunların arttığına dair epidemiyolojik kanıtlar, ölüm sonrası ASD'li bireylerin beyinlerinde nöroinflamatuvar durumların gözlemleri ve değişen sitokin seviyeleri raporları, ASD ile bağışıklık arasındaki ilişkileri göstermektedir. Biyokimyasal araştırmaların çoğu sitokinlerin interlökin ve interferon ailelerine odaklanmıştır ve buralarda bir biyobelirteç arayışı içindedir, Western blot ve ELISA teknikleri kullanılarak, otizmde çeşitli hedeflere veya spesifikliklere karşı reaktivite sergileyen antikorların varlığı tespit edilebilir. Proteomik analizler; sitokinler, kemokinler, kompleman proteinleri, adezyon molekülleri ve büyüme faktörleri gibi plazma ve serumdaki birçok bağışıklık proteininin seviyelerinin ASD'de değiştiğini gösterir. Özellikle, ASD'de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ve IL-12p40 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve ayrıca MIF (makrofaj göçü engelleyici faktör = macrophage migration inhibitory factor) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF = platelet derived growth factor) plazma seviyelerinde artışı rapor edilmiştir, kemokinler MCP-1 ve RANTES oranlarında anormallikler bildirilmiştir. Plazmadaki sitokinlerin yüksek seviyelerinin, zayıf iletişim ve bozulmuş sosyal etkileşim davranışları ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur [140-142]. Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bağışıklık sistemi hücreleri ve CNS arasındaki etkileşimler tarafından üretilen sitokinlerden biridir. TNF-alfa, beyin immün ve inflamatuvar aktivitelerinde önemli roller oynayan bir polipeptittir. Çeşitli çalışmalar, plazmada, beyin omurilik sıvısında ve

ASD'li çocukların beyinlerinde TNF- $\alpha$ 'nın yükseldiğini bildirmiştir. ASD'li çocuklarda artan serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin, visfatin ve resistin gibi adipokinlerin serum düzeyleriyle 31örele olduğu da bildirilmiştir [143]. Gelecekteki çalışmalarda bu bulgular tekrarlanırsa, yaşamın ilk birkaç gününde bağışıklık sistemi işlevinin ölçülmesinin belirli nörogelişimsel yörüngelerin erken tanımlanmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir [144]. Otizm patogeneğinde maternal bağışıklık sistemi önemli bir role sahiptir. Maternal bağışıklık sistemi ile otizm arasında ilişki ilk olarak, enfekte annelerden doğan çocuklarda otizm insidansının önemli ölçüde arttığı 1960'lardaki Kızamıkçık salgınından sonra önerilmiştir. O zamandan beri, epidemiyolojik ve hayvan çalışmaları bu hipotez için ek destek sağlamıştır, ancak maternal immün aktivasyonun (MIA) ASD riskini arttırdığı mekanizmaların oluşumu ve tam sırası hala belirsizliğini korumaktadır, bu nedenle herhangi bir tıbbi müdahale henüz geliştirilememiştir [145]. Sitokinler, kemokinler ve inflamasyon hakkında çok sayıda çalışma sitokin seviyeleri ile ASD durumu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir [146].

### IGF-1

IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1), 70 amino asit içeren tek zincirli bir polipeptittir. Genel olarak, IGF-1'in normal fetal ve neonatal sinir gelişimindeki rolleri, nöronal hasarı önlemeyi, nöronal dejenerasyonu azaltmayı ve miyelinasyonu artırmayı içerir. Otizmin etiyolojisinin IGF1 (insülin benzeri büyüme faktörü) /IGFR (IGF reseptörü) /IRS1 (insülin reseptörü substratı) /PI3K (fosfoinositid-3-kinaz) /AKT (protein kinaz B) /mTOR (Rapamisinin memeli hedefi) hücre içi sinyal yolağı bozukluklarıyla ilişkili olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Özellikle bu yolak, miyelogenezi desteklemek için IGF-1'in çevirisini etkiler. IGF-I/PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, hücre büyümesi, çoğalma, farklılaşma, hareketlilik, hayatta kalma, metabolizma ve protein sentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Doğumda ya da daha önce tespit edilen biyobelirteçler, otizmin daha sonra ortaya çıkması için öngörücü olabilirler, eksik serum IGF-1 de bunlardan biridir [50, 76]. IGF-1 otizm alanında yapılan terapötik araştırmalarda önemli bir potansiyele sahiptir, bu alanda yapılan kök hücre çalışmaları umut vericidir [147, 148]. Gelecekte PI3K/AKT/mTOR, diğer standart farmakolojik müdahalelerle kombinasyon halinde terapötik bir hedef olarak kullanılabilir [149]. Doğumda göbek kordon kanından IGF 1 ölçümü otizm tanısı için umut vadeden yöntemlerden birisidir [50].

### Fosfoinosititler

Fosfoinosititler lipid zarların temel bileşenleridir ve sinyal iletimi, zar reseptör lokalizasyonu ve aktivitesi, zar kimliğinin belirlenmesi dâhil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonun önemli düzenleyicileridir. Fosfoinositid sinyal sistemi, sinir gelişimi, hücre hayatta kalması ve plastisitenin çok önemli bir düzenleyicisidir. Otizmde değişen fosfoinositid metabolizması potansiyel bir biyomarker olarak görülmektedir. Nöronlarda fosfoinositidlerin; sinaps yapısını ve sinaptik protein sentezini düzenleyen sinyal iletimi, sinaptik vezikül endositozu, ekzositozu gibi süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. Bu işlevler, fosfoinositidlerin dinamik ve yüksek düzeyde düzenlenmiş metabolizmasına bağlıdır ve spesifik fosfoinositid kinazların ve fosfatazların iyi dengelenmiş aktivitesini gerektirir. Genetik ve fonksiyonel çalışmalardan elde edilen kanıtlar, bu enzimlerin otizm spektrum bozukluklarında sıklıkla düzensiz veya mutasyona uğramış olduğuna göstermektedir; özellikle fosfoinositid 3-kinazlar ve bunların düzenleyici alt birimlerinin sıklıkla etkilendiği görülmektedir. Bazı fosfoinositid kinazlar için izoforma özgü inhibitörler, kanser araştırmaları ve tedavisi için hâlihazırda geliştirilmiştir ve insanlar da kullanım için değerlendirilmektedir. Otizm için de fosfoinositid metabolizması terapötik hedef olarak umut vericidir [74, 150].

### Nöropeptid reseptör

Otizmli çocuklarda nöropeptid reseptör gen ekspresyonu daha düşüktür. Düşük kan nöropeptid reseptörü mevcudiyetinin, ASD'li bireylerde hastalık varlığı ve semptom şiddeti için umut verici bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Düşük nöropeptid reseptör gen ekspresyonu, sosyal davranışlarda bozulmalar ve tekrarlı basmakalıp davranışlarla ilişkilendirilmiştir [151]. Oksitosin (OT) ve arginin vazopressin (AVP), insanlar dâhil olmak üzere birçok memeli türünde bulunan, birbiriyle ilişkili iki küçük nöropeptid hormondur. Bu nöropeptitlerin düzensizliği, davranıştaki değişikliklerle özellikle de sosyal etkileşimlerle ilişkilendirilmiştir. Oksitosin (OXT) ve arginin vazopressin (AVP) sinyal yolları ve bunların reseptörleri olan OXTR ve AVPR1A otizmde biyobelirteç ve terapötik hedeflerin keşfinde umut vericidir [151, 152].

### Proteomik araştırmalar; kan protein paneli, tükürük poli omik RNA ölçümü, idrarda proteomik analizler

Proteomik analizler, plazma/serumdaki birçok proteinin seviyelerinin ASD’de değiştiğini gösterir, bu da bir protein panelinin ASD için bir kan biyobelirteci sağlayabileceğini düşündürür. Otizmde nörojenez (NFP, tubulin, tau, MAP-2 ve alfa-senklinal), miyelin oluşumu (MBP ve MAG) ve astrogliogenez (GFAP ve S100B, her ikisi de astrositler tarafından salgılanır) ile ilişkili nöral proteinlere karşı dolaşımdaki immünoglobulin (IgG) sınıfı otoantikor seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiğini gösteren araştırmalar mevcuttur. Araştırmalar ASD’li çocukların taranmasında anti-nöronal ve glial protein otoantikorlarının biyobelirteçlerinin önemini güçlü bir şekilde desteklemektedir [120, 153]. Otizmlili çocuklarda apo B-100 proteinin daha düşük olması dikkat çekicidir [154]. MikroRNA (miRNA) ve piwi etkileşimli RNA (piRNA) gibi faktörler, kromatin organizasyonunda, transkripsiyonel düzenlemede, sinaptik fonksiyonda ve diğer kritik nöronal yollarda yer alan genlerle etkileşime girer. OSB’li çocuklarda bu yolların bozulması, periferik miRNA ve piRNA seviyelerinde değişikliklere yol açabilir. Otizm teşhis süreci günümüzde ağırlıklı olarak davranışsal analizlere dayanmaktadır. Otizmin heterojenliği tek bir ölçümün tüm çocuklara genellenmesini zorlaştırmaktadır. Biyobelirteç arayışında invaziv olmayan toplama avantajıyla tükürük, diğer vücut sıvılarına özellikle kana bir alternatif olabilir, nispeten kısa bir süre içinde tekrar tekrar toplanabilir. Hem insan hem de mikrobiyal kökenli, protein ve protein olmayan moleküllerin bir nükleik asit kaynağı olarak tükürük, organizmanın mevcut durumu hakkında kompleks bir görüş sunar. Tükürük insan ve oral mikrobiyal DNA ve RNA içerir; bu nedenle izole edilen DNA ve RNA’nın çoğu oral mikrobiyomdan kaynaklanır ve izole edilmiş insan nükleik asitlerinin miktarı nispeten düşüktür fakat şu anda, tükürük örneklerinde bulunan insan nükleik asitlerini stabilize etmek ve çıkarmak için farklı spesifik toplama ve izolasyon kitleri mevcuttur [155, 156]. Tükürük poli-omik RNA ölçümü, ASD’li çocukları doğru bir şekilde tanımlayabilmede yeni, invazif olmayan bir yaklaşım olabilir. Bu teknoloji, ASD değerlendirmesi için veya ASD tanılarını için nesnel destek sağlayabilir [156]. Ayrıca kütle spektrometrisi proteomiklerini kullanarak otizmde potansiyel idrar biyobelirteçlerini analiz eden çalışmalarda mevcuttur. Yüksek oranda protein içeren kanın aksine, idrar proteinleri nispeten stabildir ve bu da onları proteomik araştırmalar için daha uygun hale getirir [157, 158].

### Metabolomik

Omik ve meta-omik disiplinleri şu anda biyolojik sıvılardan dokulara kadar geniş bir numune panelinde ASD'nin derinlemesine araştırılmasına izin vermektedir. Metabolomik, bütün bir organizmadaki hücresel sürecin son ürünleri olan tüm metabolitleri içeren biyolojik bir sürecin çalışmasıdır. Hastalar ve belirli hücresel süreçlerin geride bıraktığı sağlıklı bireyler arasındaki metabolit parmak izlerinin belirlenmesi, insan hastalıklarının patofizyolojisi hakkında fikir verebilir. Otizmlili bireylerde serum metabolitlerindeki farklılıklar potansiyel biyobelirteç olabilir [119, 159]. Yapılan bir çalışmada; otizmin 2 özel metabolitle ilişkili olduğu gösterilmiştir: sfingosin 1-fosfat ve dokosaheksaenoik asit [159].

### Tam kan sayımı, hemogram

ASD'li bireylerde immünolojik anormallikler ilk olarak 1977'de rapor edilmiştir [160]. ASD'nin altında yatan kesin patofizyolojiler belirsiz olsa da, artan kanıtlar düzensiz nöroinflamasyonun rolünü desteklemektedir. Bazı inflamatuvar belirteçler, geleneksel ve ucuz tam kan sayımı (CBC) yöntemiyle incelenebilir. Kan hücresi sayımı, kırmızı kan hücreleri, monositler, nötrofiller, lenfositler, kandaki trombositler gibi hücre bileşimi ve ayrıca nötrofil-lenfosit oranı (NLR), trombosit-lenfosit oranı, lenfosit-monosit oranı (LMR) gibi sistemik inflamatuvar yanıtlar için belirteçler olarak kullanılabilen hücre oranları hakkında bilgi sağlamaktadır. Otizmin immünolojik boyutu ele alındığında periferik kanda kronik inflamasyonun bir göstergesi olan yüksek monosit seviyesi ve ASD şiddeti ile ilişkili lenfosit-monosit oranı LMR'nin otizmde tanısal bir değeri olabilir. Otizmde trombosit fonksiyonlarında bozulma öngören araştırmalar mevcuttur. ASD'nin şiddeti açısından bu parametrelerin rolünü anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [161-163]. Yüksek kan monosit sayıları genellikle otoimmün ve bazı bulaşıcı hastalık durumlarında bulunur. Neopterin proinflamatuvar bir bağışıklık durumunun göstergesidir. Yüksek neopterin seviyeleri, yüksek hücre aracılı bağışıklık ile tutarlı olarak, iyi bilinen bir bağışıklık aktivasyon belirtecidir. Sitokin interferon gama tarafından uyarıldığında, monositler ve makrofajlar artan miktarlarda neopterin molekülü üretir. Yüksek neopterin seviyeleri, monosit/makrofaj aktivasyonunun yanı sıra T hücrelerinin aktivasyonu ve hücre aracılı bağışıklığın bir göstergesi olarak hizmet eder, otizmlili bireylerde bu değerlerin kontrollere kıyasla yüksek olduğunu bildiren araştırmalar mevcuttur [164].



### Folata bağılı tek karbon metabolizması

Folat, pürin ve timidin biyosentezi, glisini serine dönüştürerek ve metionini sentezleyerek amino asit homeostazını sürdürmek, homosistein yeniden metilasyonu yoluyla epigenetiği korumak ve redoks türlerinin üretilmesi ve tüketilmesi için önemlidir. Transsülfürasyon (TS) yolu, folat bağımlı tek karbon metabolizması (FOCM) ile iç içedir ve hücre içi redoks durumunun korunmasına ve toksinlerin vücuttan atılmasına yardımcı olan birincil bir antioksidan olan glutatyon üretiminden sorumludur. Bu yollar içindeki anormallikler, özellikle azaltılmış bir S-adenosilmetiyoninin S-adenosilhomosisteine oranı (DNA metilasyonu için kapasitenin azaldığını düşündürür) ve oksitlenmiş glutatyonun indirgenmiş glutatyon oranının artması (hücre içi oksidatif stresin daha yüksek seviyelerini gösterir), ASD ile yakından ilişkilendirilmiştir [38]. Bozulmuş FOCM ve transsülfürasyon (TS) yolları ASD tanısını tahmin etmek için araştırmalar sürdürülen yollardan birisidir. Klinik bir ASD biyobelirteci için en umut verici adaylardan biri, FOCM/TS ölçümlerini kullanan kan bazlı bir testtir. FOCM ve TS; DNA metilasyonu ve redoks durumunu tanımlayan ölçümlerdir bu nedenle sadece tanısal belirteçler olarak değil, aynı zamanda gelecekte tedavi sonucunun göstergeleri olarak da değer sunabilir [165]. FOCM/TS metabolitlerini tanı amaçlı araştırmanın yanı sıra, FOCM ve TS yollarındaki aktivitenin düzeltilmesi, otizm patofizyolojisine katkıda bulunan altta yatan biyolojik süreçleri etkileyebilir ve böylece bu yollarda metabolik anormallikleri klinik tedavi için umut verici hedefler haline getirebilir [166].

### Beyin temelli biyobelirteçler

Beyin görüntüleme temelli çalışmalarda; tarayıcı ortamında uzun süre hareketsiz kalma ve sözlü talimatlara uyma gereksinimi araştırmalara kısıtlılık getirmektedir, doğal görsel dikkatin incelenmesi gibi yaklaşımların bazıları daha umut verici geniş ölçekli uygulamalara sahiptir. Gri madde hacmi, kortikal kalınlık, beyaz cevher mikro yapısı, amigdalanın aşırı büyümesi, subkortikal hacimler, superior temporal sulkus anormallikleri biyobelirteç araştırmalarında önemli potansiyele sahiptir. Yapısal emar, dinlenme durumunda fonksiyonel MRI, çok modlu MR çalışmaları ile biyobelirteç arayış çalışmaları devam etmektedir, daha büyük örneklemli çalışmalara ihtiyaç vardır [113, 167]. N170, yüz algısının iyi çalışılmış bir nöral belirteçidir. Bu yüze duyarlı olaya ilişkin potansiyel (ERP), bir yüzün

görüntülenmesinden ~170 milisaniye (ms) sonra oksipitotemporal kafa derisi üzerinde negatif bir sapma olarak belirlenmiştir [168]. Nörolofizyoloji alanında yapılan uyarılmış yanıt çalışmalarında Yüzdeki N170 latansı ASD için olası bir biyobelirteç olarak görülmektedir fakat örneklem küçüklükleri, IQ gibi etkiler nedeni ile daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Görsel dikkat, klinik ortamda yaygın uygulama potansiyeli nedeniyle ASD için erken bir biyobelirteç olarak daha yaygın kullanılsada küçük çocuklar üzerinde daha fazla randomize çalışmalara ihtiyaç vardır [169, 170]. ASD’de makrosefali prevalansı, kontrollere kıyasla daha yüksektir, Aşırı Toplam Beyin Hacmi, çeşitli araştırmalar da otizm ile ilişkilendirilmektedir [171].

### Eser element değişiklikleri

Mevcut veriler, ASD ile biyolojik olarak gerekli ve toksik eser elementlerin durumu arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Araştırmalar otizmlili çocukların lityum (Li), manganez (Mn), selenyum (Se), baryum (Ba), cıva (Hg) ve kalay (Sn) düzeylerinin yaş ve cinsiyete göre önemli ölçüde azaldığını göstermektedir, plazma krom (Cr) ve vanadyum (V) konsantrasyonlarında artış bildirmektedir [172]. Metallerin nörogelişim üzerindeki genel etkisi önemlidir. Birçok çalışma, metallerin, özellikle cıva (Hg), çinko (Zn), bakır (Cu), alüminyum (Al) ve kurşunun (Pb) ASD’nin gelişimi üzerindeki olası etkisini araştırmıştır [173]. Örneğin kurşuna gelişimsel süreçte maruziyet NMDA reseptör hipofonksiyonuna ve ardından beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) sinyalleşmesinin düzensizliğine yol açabilir. Pb, cıvadan sonra küresel halk sağlığı komplikasyonlarının %0,6’sına katkıda bulunan en tehlikeli 2. Ağır metaldir. Merkezi sinir sistemi Pb’ye karşı oldukça hassastır ve doğum öncesi ve doğum sonrası kritik dönemlerde maruziyet anormal nörogelişime yol açar ve nörodavranışsal bozukluklara neden olur. Nörotoksitesinin olası iyileştirilmesi beyin sinaptik fonksiyonlarında olumlu etkiler getirebilir. Otizmin kesin etiolojisi bilinmemekle birlikte, çalışmalar genetik ve çevresel kirlenmeler arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Çevre kirlenici ağır metallerden biri olan kurşun (Pb) otizm ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle hamilelik sırasında annenin Pb’ye maruz kalması gelişmekte olan fetüste oksidatif stresi artırır, nörogelişimi etkiler ve otistik benzeri davranışlara neden olur [174, 175].

## Genetik

Otizmin görünürdeki yüksek kalıtsallığı nedeniyle, altta yatan genetiğine odaklanan araştırmalar uzun süredir devam etmektedir. Genetik testler, bazı genetikçilerin, genomun kodlama yapmayan bölgelerinin dâhil olduğu bozuklukları tanımlamak ve poligenetik faktörlerin karmaşık etkilerini incelemek için tüm genom dizilimini gerçekleştirmesiyle gelişmeye devam etmektedir. ASD ile ilişkili, bilinen genomun dışında yeni genler araştırılmaktadır [121]. Otizm tanılı bireylerde otizmin şiddeti ve fenotipi, hastalar arasında önemli bireysel farklılıklar ile heterojendir. Otizm tanılı bireylerdeki heterojenlik hem lokus hem de allelik heterojenliği içerir. Kapsamlı araştırmalara ve genetikteki bazı keşiflere rağmen, bugün hala otizm teşhisi ile toplu olarak ilişkili herhangi bir genetik farklılık seti tanımlanmamıştır. Folat ve Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) polimorfizmleri otizmi ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, hücre sinyalizasyonu, hücre adezyonu ve sinaptik fonksiyon veya plastisite ile ilgili protein ailelerinin bazı fonksiyonel üyelerini kodlayan bu genlerdeki diğer bazı mutasyonlar örneğin, SHANK, neurexins, nöroligin proteinleri, glutamat reseptörleri, BDNF ve KIRREL3, TOR ve FMRP sinyal yolları, otizm teşhisi konanların sergilediği semptomlarla ilişkili nedensel hipotezlerle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bu proteinlerin gen düzenlenmesindeki rollerinde henüz belirsizlikler olsada çok sayıda biyolojik yol yapılan araştırmalarda otizm ile ilişkilendirilmiştir [143]. MikroRNA'lar (miRNA'lar), 18-25 nükleotid uzunluğunda, mesajcı RNA'lara bağlanarak transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebilen, kodlanmayan küçük RNA molekülleri grubudur. İnsanlarda tanımlanmış miRNA'ların yaklaşık yarısı beyinde ifade edilir ve merkezi sinir sisteminin gelişimi ile ilgili birçok biyolojik süreç için önemli düzenleyici işlevlere sahiptir. miRNA biyogenezindeki ve miRNA-hedef etkileşimindeki bozulmalar, psikiyatrik bozukluklar da dâhil olmak üzere CNS hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir, ASD çalışmalarına miRNA'ların dâhil edilmesi, farklı hastalık alt grupları arasında ayırım yapılmasını kolaylaştıracaktır [176]. ASD ile ilişkili yapısal DNA değişiklikleriyle ilgili araştırmalar, Down sendromu gibi iyi bilinen kromozomal değişiklikleri, 15q11.2 mikrodelsyonu gibi kopya sayısı varyasyonlarını, Phelan McDermid Sendromu gibi tek gen bozukluklarını ve Fragile X gibi trinükleotid tekrar bozukluklarını içerir. Bununla birlikte, çalışmalar yapısal genetik kusurların otizm vakalarının yaklaşık %15-20'lik bir kısmından sorumlu olduğunu ileri sürmekte ve daha çok nokta mutasyonlarına odaklanmaktadır. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) olarak bilinen genomdaki yaygın varyasyonlar, otizmde dikkat

çekicidir. Çoğu SNP sessizdir, çünkü %98'i DNA'nın intron veya intergeneik bölgelerinde meydana gelir. Bununla birlikte, bazıları otizm gibi değişken semptomatik koşullarda tanımlanmıştır. Bir polimorfizm olarak sınıflandırılması için, en az %1 veya daha fazla bir oluşum frekansına sahip olmalıdır. Potansiyel otizm gelişiminin belirlenmesiyle ilgili olabilecek SNP'lerden bazıları şunlardır: İnsülin reseptörü benzeri büyüme faktörü (IRS-1)—G972R, DESP15—rs3746599, IGF1/TasI ve IGF1/SmaBI, IGF-1—rs1520220, IRS-1—rs1801123, FOXP2—rs2056202rs—2292813, GSB3—rs878960. Çeşitli dokuların genomunda ölçülen metilasyon paternleri, otizmi tanımlayan başka bir olası tanı aracı olarak araştırılmaktadır [50, 169]. Son 40 yılda otizmin genetiğine ilişkin çok ilerleme kaydedilmiştir. Aile ve ikiz çalışmaları ile otizmin kalıtsal yönü ortaya koyulmuş ve tipik olarak çok faktörlü bir kökene sahip olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, otizm, genetik heterojenliğin yanı sıra muazzam bir klinik heterojenlik gösterir. Genetik keşifler büyük bir ilerlemeyi temsil ederken, bu çalışmaları klinik araştırmalarla ilişkilendirmeye ihtiyaç vardır [62].

### Mitokondrial disfonksiyon

ASD'li çocuklarda mitokondriyal disfonksiyonun biyobelirteçleri yaygındır. Karnitin, laktat, piruvat ve laktat/piruvat oranı anormallikleri otizmde tanımlanan anormal mitokondriyal fonksiyon belirteçleridir. Ayrıca kreatin kinaz, amonyak ve aspartat aminotransferaz (AST) gibi diğer standart kan belirteçleri, otizmde mitokondriyal işlev bozukluğu için yaygın olarak kullanılan biyolojik belirteçlerdir. Laktat dehidrojenaz, laktat oksidaz, piruvat kinaz ve heksokinaz, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz, Kaspaz-3 gibi yeni mitokondriyal işlev bozukluğu biyobelirteçleriyle, otizmi kontrollerden ayırt etmeye çalışan araştırmalar mevcuttur. Ölçümlerin standardize olmaması, örneklem küçüklükleri ve mitokondriyal işlev bozukluğunun biyobelirteçlerinin spesifik olmayan doğası, otizm araştırmalarının bu alanındaki ilerlemesini kısıtlamaktadır [121, 169]. Şu ana kadar yapılan otizm alanındaki mitokondriyal disfonksiyon çalışmalarında; bağışıklık ve bukkal hücrelerde, fibroblastlarda, kas ve gastrointestinal dokuda ve otizimli bireylerin beyinlerinde mitokondriyal anormallikler tanımlanmıştır. Birkaç vaka serisi, otizmdeki mitokondriyal disfonksiyon ile epilepsi arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir. Mitokondri, doğrudan eksojen çevresel stresörlerden ve ikincil olarak ROS, inflamatuvar mediatörler ve enterik mikrobiyom gibi lokal metabolik modulatorler gibi içsel faktörlerden etkilendiğinden, otizmde mitokondrial

disfonksiyon gen çevre etkileşimleri ile ilişkilendirilmiştir. Mitokondriyal disfonksiyonun etiyolojisi ve otizmlı bireylerde nasıl tanımlanacağı şu anda net değildir [177].

### Gama aminobütirik asit (GABA)

Gama aminobütirik asit (GABA), glutamat dekarboksilazın etkisi sayesinde glutamattan elde edilir ve nöronal uyarılabilirliği dengeleyen karmaşık ve homeostatik bir ilişkiye sahiptir. Olgunlaşmamış beyinlerde, GABA reseptörleri yetişkin beyinlerinden farklıdır. GABA, beyin gelişimi sırasında ana uyarıcı nörotransmitteri temsil eder ve proliferasyon, migrasyon, sinaps olgunlaşması, farklılaşma ve hücre ölümünü etkiler. Gabaminerjik ve glutaminerjik sistemlerdeki değişiklikler, uyarıcı/inhibitör dengenin bozulmasına neden olur ve ayrıca otistik davranışlar ve çeşitli nörogelişimsel bozukluklar için potansiyel mekanizmalardır. Otizmlı çocuklarda plazma GABA ve glutamat seviyeleri değişir. Özellikle, plazma GABA'sında ve glutamat/glutamin oranında önemli bir yükselme varken, plazma glutamin seviyeleri ve glutamat/GABA oranları kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşüktür. GABA ve glutamat nörofizyolojisindeki uyarıcı ve engelleyici mekanizmalar arasındaki bu dengesizlik, gelişimsel gecikme ve zeka geriliği, şizofreni ve epilepsi gibi diğer nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilmektedir. Otizmde GABA modülatörleri ile farmakolojik yaklaşım, uyarıcı glutamaterjik ve inhibitör GABAerjik yollar arasındaki dengesizliği hedeflemeyi amaçlar. Arbaklofen, akamprosat, bumetanid ve valproat en çok çalışılan maddelerdir. Örneğin Arbaklofen gibi GABA<sub>A</sub> agonistleri, GABA'yı aktive eder ve glutamat salınımını preklinik olarak inhibe eder. Teorik olarak bu, ASD'de uyarıcı ve engelleyici nörotransmisyon dengesini yeniden sağlamalıdır, bunun için büyük örneklem gruplarına sahip daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır [178, 179]. Otizmde anormal GABA işlevine ilişkin kanıtlar sınırlıdır. Birkaç vaka raporu ve küçük çalışma, kontrollere kıyasla plazma, trombositler ve idrardaki GABA seviyelerinde farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Yükselmiş plazma GABA seviyeleri, Otistik Bozukluğun biyokimyasal bir belirtici olabilir. Giderek artan araştırmalar, Otistik Bozukluğun etiyolojisinde veya patofizyolojisinde GABAerjik mekanizmaların rol oynadığı hipotezini desteklemektedir [180].

Besinsel (Folat, B12 Vitamini, D Vitamini, PUFA-Omega 3, Selenyum, Ubikinon10-koenzim Q10)

Hamilelik sırasında folat, embriyoda otizm gelişimi ile karmaşık bir ilişkiye sahiptir. Hamilelikte folat eksikliği, yavruların otizm geliştirme riskini artırır fakat bununla birlikte doğumda çok yüksek maternal folat veya vitamin B12 kan konsantrasyonlarının, otizm geliştirme riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu öne süren çalışmalarda mevcuttur bu nedenle doz çok önemlidir. Folatın plasenta boyunca taşınması ASD'li çocukların annelerinde bloke olabilir ve bu da kanda daha yüksek folat seviyelerine neden olabilir. ASD'li çocukların annelerinde Folat Reseptör Alfa Otoantikorları (FRAA'lar) ve redükte folat taşıyıcısında (RFC) tek nükleotid polimorfizmi (SNP) prevalansı daha yüksektir [121].

Diğer önemli beslenme biyobelirteçleri, gebelikte ve otizmlili bireyler de D vitamini eksikliğidir. D vitamini, nörogelişimde önemli rol oynayan bir nörosteroid hormondur. Nöral hücre proliferasyonu, nörotransmisyon, oksidatif stres ve bağışıklık fonksiyonu, Merkezi Sinir Sisteminde D vitamininin aracılık ettiği ana mekanizmaları temsil eder. Bu nedenle, hamilelik ve erken çocukluk döneminde eksikliği, gelişmekte olan bir beyni önemli ölçüde etkileyerek ASD dâhil olmak üzere olası olumsuz nöropsikolojik sonuçlara yol açabilir. D vitamini eksikliğinin otizmin etyopatogenezindeki olası katkısını ve ASD çekirdek semptomlarının iyileştirilmesinde hormon takviyesinin potansiyel etkinliğini daha iyi anlamak için hamilelik ve erken bebeklik döneminde yürütülen daha fazla Randomize Kontrollü Çalışmalar gereklidir [181].

Birkaç çalışma, ASD'de yer alan nöronal süreçlerde ve immün modülasyonda lipidlerin temel rolünü vurgulamıştır. Özellikle, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), beyin gelişimi ve olgunlaşması için gerekli olan temel yağ asitleridir. Beslenme yoluyla sağlanmaları gerektiğinden, bu besinlerdeki eksiklikler veya dengesizlikler, hem öncüler hem de uzun zincirler beyin fonksiyonlarını yalnızca gelişim sırasında değil, aynı zamanda yaşam boyunca ve özellikle nöroinflamasyon dönemlerinde güçlü bir şekilde etkiler. Son kanıtlar, n-3 PUFA homeostazının ASD'de, ya beslenme dengesizliği ya da genetik kusurun bir sonucu olarak değişebileceğini düşündürmektedir. n-3 PUFA eksikliği modelleri üzerine yapılan çok sayıda çalışma, GABAerjik, dopaminerjik ve kolinerjik nörotransmisyonunda derin değişiklikleri ortaya çıkartmıştır. Lipid metabolizması gen alelleri, PUFA metabolizması ve beyin hastalıkları arasında bazı bağlantılar mevcuttur. Beslenme

müdahaleleri, özellikle n-3 PUFA'ların anti-inflamatuar özelliklerinden yararlananlar, ASD'de hem nöroinflamatuvar bileşenleri hem de mikrobiyota disbiyozunu potansiyel olarak modüle edecekleri için umut verici adaylardır [140].

Selenyum, selenoproteinler aracılığıyla antioksidan savunma sağlayan temel bir mikro besindir. Selenyum insan sağlığı için elzemdir ve spesifik selenoproteinlerin antioksidan aktivitesi (veya eksikliği), merkezi sinir sistemi hastalıklarında özellikle ilgi çekicidir. Beyin vücuttaki tüm organlar arasında metabolik olarak en aktif olanıdır ve toplam kütlenin sadece %2'sini temsil etmesine rağmen, beyin metabolizması insan vücudu tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık %20'sini ve glikozun %25'ini oluşturur. Bu yüksek metabolik aktivite ile uyumlu olarak, beyindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonu, onu peroksidasyona karşı daha savunmasız hale getirir. Selenoproteinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle, serbest radikal savunma sisteminin bir parçası olarak temel roller oynarlar [182].Çeşitli araştırmalar, otizmlili çocukların saçlarında ve kanlarında, kontrol grubu çocuklara göre önemli ölçüde daha düşük Se düzeylerine sahip olduğunu göstermiştir. Selenyum takviyesi otizmlili çocukların klinik semptomlarını hafifletebilir mi? Bu soru için alanda yeni araştırmalara ihtiyaç vardır. Se, nörotransmitter seviyelerini düzenleyerek, oksidatif stresi azaltarak, nöroinflamasyonu hafifleterek ve nöral hücre hasarını kurtararak hipokampüste koruyucu bir rol oynayabilir [131, 183].

Beyin mitokondrisi, serbest radikallerin oluşumunda ve ATP üretiminde önemli bir rol oynar. Mitokondrideki solunum zincirinin önemli bir bileşeni, hücre biyoenerjitiği için önemli bir faktör olan Koenzim Q 10'dur (CoQ 10 ). Bir antioksidan olarak oksidatif stresi azaltır. Otizmlili çocuklarda ubiquinol destekleyici tedavisinin davranış, fizyolojik işlevler, antioksidan durum ve lipid peroksidasyonu gibi yararlı etkileri yeni araştırmalarla değerlendirilmelidir [184].

Ayrıca bu konulara ek olarak;

-Tioredoksinler

-Plazma F2t izoprostanlar

-Lipofuksin

-Plazma 3 klortirozin

- 3 Nitrotirozin
- Neopterin
- Homosistein ve sistein
- Sülfat
- Kortizol
- Porfirinler
- M 50, M100
- İşitsel salınım (MEG auditory oscillations)
- Metilasyon
- Açıl karnitin
- Laktat
- Pirüvat
- Laktat/ pirüvat oranı
- Alanin/ lizin oranı
- Zonulin
- Fetal beyin antikorları
- Kalp atış hızı değişiklikleri
- EEG Gama band
- Mikrobiyota
- Asetilkolin
- Dopamin
- Tiamin
- Histamin

gibi konular da otizm ve biyobelirteç arayışı konusunda ele alınan başlıklar arasında yer almaktadır [121, 143, 185-187].



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için gerekli olan etik kurul izni Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (18.05.2021 tarihli, G.Ü.ET-21.031 kod numaralı). Gazi BAP birimine yapılan proje önerisi başvurusu 19.08.2021 tarihinde kabul edilmiş ve desteklenmesi uygun görülmüştür (Proje Başlığı: Deneysel otizm modelinde transaurikular nervus vagus stimülasyonun pro inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler üzerine etkilerinin incelenmesi, Proje No: TDK-2021-7245, Proje Türü: Doktora, Süresi: 18 Ay, Başlama Tarihi: 19.08.2021). (Araştırmamızda 20.029 kod nolu çalışmada kullanılan 30 adet C57BL6 farenin yavrularından elde edilen dokuları kullanılmıştır BAP Proje No: 76/2020-01)

Çalışmamızda; GÜDAM laboratuvarlarından 8-10 haftalıkken satın alınan C57BL/6 dişi farelerden elde edilen yavru fareler kullanılmıştır. Otizmlili yavru grupları gebe farelere VPA uygulanarak elde edilmiştir. Bir anne fareye maksimum iki kez VPA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu yavrularını elde ettiğimiz annelere herhangi bir kimyasal uygulaması gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmamız için 3 grup oluşturulmuştur; Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu (KOTASG), Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG), Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG). Her grup 8 dişi, 8 erkek yavru olmak üzere 16 yavru ile oluşturulmuştur. 32 adet otistik davranış gösteren C57BL/6 yavru fare ve 16 adet C57BL/6 sağlıklı yavru fare olmak üzere toplamda 48 adet C57BL/6 yavru fare kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de kronik etkilerin inceleneceği yavruların grupları gösterilmektedir.

Otizm spektrum bozukluğunun valproik asit (VPA) hayvan modeli, sahada en yaygın kullanılan hayvan modellerinden biridir. Bu model, otizmlili bireylerde görülebilecek birçok yapısal ve davranışsal özelliği göstermektedir. VPA, yaygın olarak kullanılan bir antikonvülsan duygudurum düzenleyicidir. VPA maruziyet modeli, ASD çalışması için en doğrulanmış modellerden biri olarak kabul edilir ve ASD'nin etiyolojisini, gen ekspresyonunu ve nöronal işleyişini incelemek için önemli bir araçtır. Otizm modelinde hipokampüste piramidal hücre kaybı gibi bir dizi değişiklik meydana gelmektedir. Gebelik sırasında VPA'ya maruz kalma zamanlamasının VPA'nın davranış üzerindeki etkilerini etkilediği göz önünde bulundurulmalıdır. Araştırmalar fare ve ratlarda gebelikte embriyonik

günün 9 ve 14,5. günleri arasında VPA'ya maruz kalmanın otistik benzeri davranışlar geliştirmeye sebep olduğunu göstermektedir. Otizm benzeri davranışlar için gebeliğin 12,5. embriyonik gününde VPA'ya maruz kalmanın en etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Otistik fareleri elde etmek için gebe farelere gebeliklerinin 12,5 gününde 600 mg / kg VPA gavaj ile verilmiştir, toplam gebelik süreleri yaklaşık 21 gündür. Tüm hayvanlar gavaj uygulamasından hemen sonra kafeslerine geri getirilmiştir, doğan yavrular süttten kesilene kadar rahatsız edilmeden bırakılmıştır. Yavrular anneler ile 28 gün aynı kafeste tutulmuştur. Araştırmamız GÜDAM'dan temin edilen C57BL/6 farelerin çiftleştirilmesi, VPA uygulaması, yavrulara deney uygulanması, stimülasyon grubuna VNS uygulanması, sakrifikasyon ve analizler şeklinde ilerlemiştir.

### 3.1. Yavrular

Yavru fareler doğduktan sonra (P1) kuyruklarına rakamlar yazılarak ayrı ayrı etiketlenmiş ve cinsiyetleri (anogenital mesafeye göre) belirlenerek, bireysel vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Anogenital mesafe kumpas ile ölçülerek belirlenmiştir.

P 28'de süttten kesilinceye kadar yavru farelerin tümü anneleri ile birlikte bırakılmış ve hiçbir uygulanma yapılmamıştır. P 28'de süttten kesilen yavrular ayrı ayrı, en az 4 adet yavru aynı kafese yerleştirilmiştir (4 yavru/ 1 kafes). Otistik davranış sergileme durumlarını kontrol etmek için; 8. haftaya gelen yavru farelere doğal anksiyete testleri olan open field test ve elevated plus maze test ve sosyal anksiyete testi olan mirrored chamber test ve three chamber test uygulanmıştır. Yavrulara her gün 1 deney uygulanmış ve deneylerin sonuçlarına göre her yavru otistik davranış bakımından değerlendirilmiştir.

#### 3.1.1. Kronik etkilerin incelendiği gruplar

1. Grup; Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG); bu gruba cihaz yerleştirilmesi yapılmamıştır, stimülasyon verilmemiştir fakat tüm gruplarda uygulanan davranış testleri uygulanmıştır. Bu grupta 16 adet sağlıklı yavru fare kullanılmıştır. Elisa çalışmaları için 8. Haftada başlanan deneylerden 1 ay sonra sakrifiye edilmiştir.

2. Grup; Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG); bu gruba cihaz yerleştirilmesi yapılmamış, stimülasyon verilmemiş fakat tüm gruplarda uygulanan davranış testleri uygulanmıştır. Bu

grupta 16 adet otistik yavru fare kullanılmıştır. Elisa çalışmaları için 8. Haftada başlanan deneylerden 1 ay sonra sakrifiye edilmiştir.

3. Grup; Kronik Otistik ve Transcutanöz Auricular Stimülasyon Uygulanan Grup (KOTASG); bu grupta transcutanöz auricular stimülasyon cihazı 2 kulağa da takılmış ve 2 kulaktan aynı anda transcutanöz auricular stimülasyon uygulanmıştır ve 16 adet otistik davranış sergileyen yavru fare kullanılmıştır. Elisa çalışmaları için stimülasyon uygulamasından 1 ay sonra sakrifiye edilmiştir.

Kronik dönem etkilerin incelendiği gruplar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kronik dönem etkilerin inceleneceği grupların dağılımı

| <b>Grup numaraları</b> | <b>Gruplar</b>                                                              | <b>Grup alt başlıkları</b>                                    | <b>Gruptaki yavru sayıları</b> | <b>Gruba yapılacak işlemler</b> | <b>İşlemin sonlandırılma zamanı</b>   | <b>Grupta toplam yavru sayısı</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>1</b>               | <i>Kronik, Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG)</i>                                | Kronik, Sağlıklı Kontrol Grubu a                              | 8 adet sağlıklı dişi yavru     | Elisa çalışmaları               | 1 ay sonra                            | 16 adet sağlıklı yavru            |
|                        |                                                                             | Kronik, Sağlıklı Kontrol Grubu b                              | 8 adet sağlıklı erkek yavru    | Elisa çalışmaları               | 1 ay sonra                            |                                   |
| <b>2</b>               | <i>Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG)</i>                                  | Kronik Otistik Kontrol Grubu a                                | 8 adet otistik dişi yavru      | Elisa çalışmaları               | 1 ay sonra                            | 16 adet otistik yavru             |
|                        |                                                                             | Kronik Otistik Kontrol Grubu b                                | 8 adet otistik erkek yavru     | Elisa çalışmaları               | 1 ay sonra                            |                                   |
| <b>3</b>               | <i>Kronik, Otistik ve Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu (KOTASG)</i> | Kronik, Otistik ve Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu a | 8 adet otistik dişi yavru      | Elisa çalışmaları               | Stimülasyon uygulamasından 1 ay sonra | 16 adet otistik yavru             |
|                        |                                                                             | Kronik, Otistik ve Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu b | 8 adet otistik erkek yavru     | Elisa çalışmaları               | Stimülasyon uygulamasından 1 ay sonra |                                   |

### 3.1.2. Davranış deneyleri

Open Field Test (OFT), Elevated Plus Maze (EPM), Mirrored Chamber Test (MCT), Three Chamber Test (TCT) olmak üzere 4 farklı davranış deneyi ile hayvanların davranış deneyleri sağlanmıştır. Kronik grup için ilk hafta davranış deneyleri ardından üç hafta haftada 2 gün 30 dk stimülasyon, son hafta davranış deneyleri ve sakrifikasyon uygulanmıştır. Stimülasyon uygulanan günde davranış deneyi yapılmamıştır.

### 3.1.3. TVNS

2010 yılında, vagus sinirin kulak kepçesini (Nemos® cihazı) uyaran yeni bir non-invaziv transkutanöz VNS (tVNS) cihazı, farmakoresistant epilepsinin tedavisi için Avrupa onayını almıştır. Benzer şekilde, electroCore LLC gammaCore cihazı (Basking Ridge, NJ, ABD) birincil baş ağrısını tedavi etmek için invazif olmayan bir vns'dir. tVNS, migren, depresyon ve epilepsinin tedavisinde insanlarda ve kemirgen modellerinde çeşitli pilot çalışmalarda test edilmiştir.

Vagus sinirin aurikular dalının (tVNS) noninvaziv bir elektrik transkutanöz vagus sinir stimülasyonu, vagus sinirin afferent ve efferent merkezi çekirdeklerinin aktivasyonu ile gösterildiği merkezi döngüsüyle sonuçlanır.

Araştırmamızda stimülasyon uygulanacak gruba (KOTASG); elektriksel uyarıcı ile transkutanöz vagus sinir stimülasyonu (tVNS) genel anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Stimülasyon izolatör ile her iki kulağın konkasına 5 V, 1 mA, 10 Hz atımlı darbe stimülatörü, 250 mikro saniye atım genişliği ve bifazik olarak (Vagustim Türkiye) 30 saniye on, 30 saniye of toplam 30 dakika stimülasyon haftaları boyunca haftada iki kez yapılmıştır.



Resim 3.1. TVNS. Farelerde genel anestezi altında, vagustim cihazı ile trans auricular vagus sinir stimölasyonu (C57BL/6). Resim Gazi Üniversitesi Tıp Faköltesi'nde “Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Merkezi” projeleri kapsamında ekibimiz tarafından gerçekleştirilen vagus siniri uyarım çalışmalarından elde edilmiştir

#### **3.1.4. Kan ve dokuların toplanması ve deneye hazır hale getirilmesi**

Tüm uygulamalar bittikten sonra yavru farelerin hepsi sakrifiye edilip hızlıca tüm merkezi ve periferik santral sinir sistemi yapıları izole edilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneklerin sakrifiye tarihleri

|            |                |              |              |
|------------|----------------|--------------|--------------|
| 08.10.2021 | 2D-2E(KOTASG)  |              |              |
| 04.11.2021 | 2D-1E(KOTASG)  |              |              |
| 14.01.2022 | 3D-3E (KOTASG) |              |              |
| 22.04.2022 | 1D-1E (KOTASG) | 1D-1E(KOKG)  | 1D-4E (KSKG) |
| 27.05.2022 | 1E (KOTASG)    | 7D-2E (KOKG) |              |
| 25.08.2022 |                |              | 2D-3E(KSKG)  |
| 27.10.2022 |                | 5E (KOKG)    |              |
| 11.11.2022 |                |              | 5D-1E (KSKG) |

*KOTASG: Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu, KOKG: Kronik Otistik Kontrol Grubu, KSKG: Kronik Sağlıklı Kontrol*

#### Kan dokularının hazırlanması

Yavru fareler sakrifiye edilmeden hemen önce kardiyak kanları insülin enjektörleri kullanılarak boş tüplere toplanmış ve etiketlenmiştir. Toplanan kanlar 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. Kanlar santrifüj cihazında; +4°C’de, 5000 RPM’de, 10 dakika santrifüj edilmiştir ve serumları elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant kısımları dikkatli bir şekilde boş eppendorf tüplerine toplanarak etiketlenmiş ve ELİSA analizine kadar saklanmak üzere -80°C’de soğutucu dolaplara kaldırılmıştır ( 88400V -86 THERMO Buzdolabı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı). Deney gününde serumlar çözündürme protokollerine uygun bir şekilde çözündürülmüş ve oda ısısına geldikten sonra kullanılmıştır.

#### Beyin dokularının hazırlanması

Beyin dokuları hayvanlar sakrifiye edildikten sonra hassas terazi ile tartılarak hızla eppendorf tüplerine alınmış, etiketlenmiş ve kuru buz içerisinde hızla -80 dolabına transfer edilmiştir ( 88400V -86 THERMO Buzdolabı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı). Beyin dokuları deney gününde homojenize edilmiştir. Beyin dokularını içeren eppendorf tüpleri; deney gününde öncelikle kuru buz içerisine alınmış.

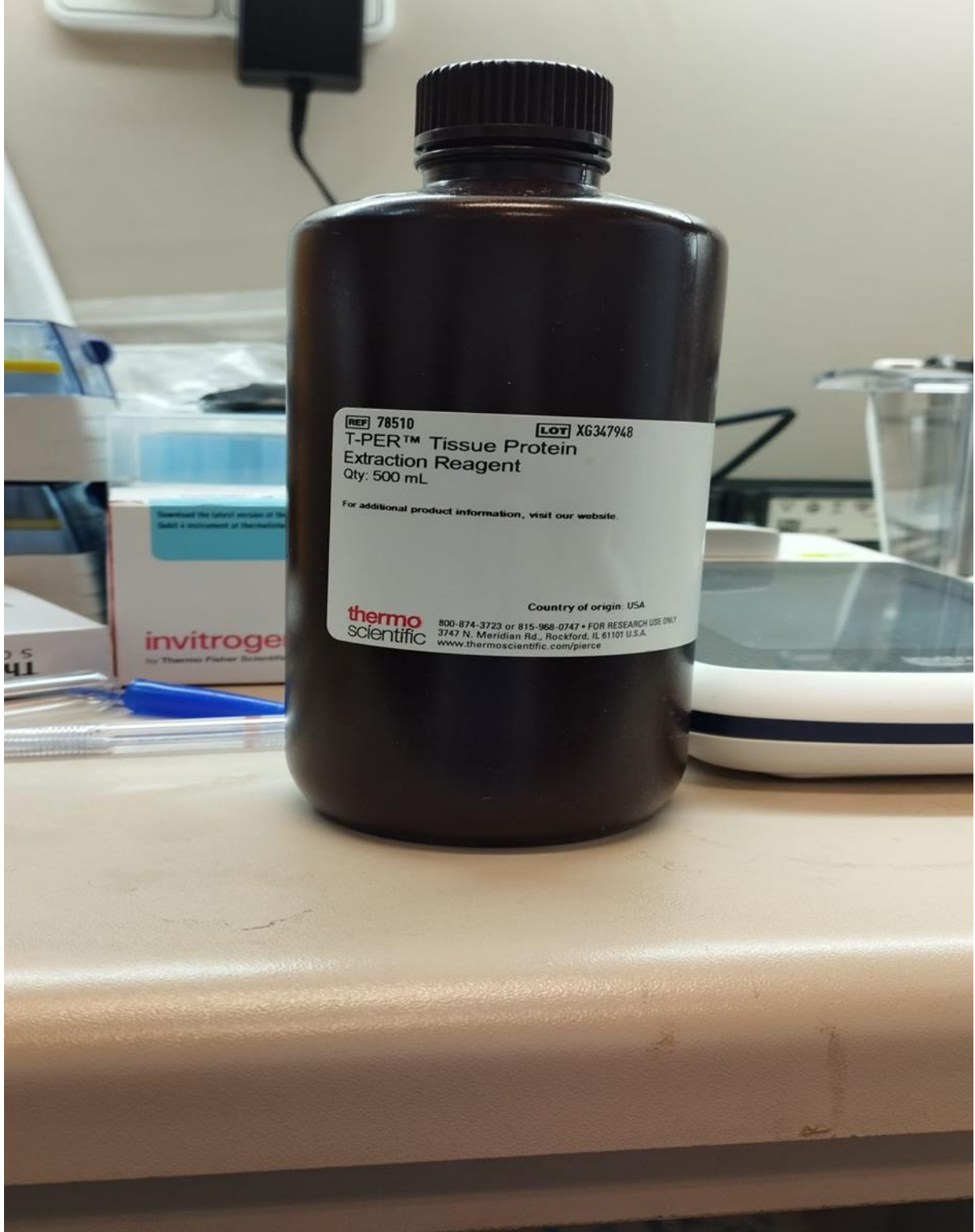


Resim 3. 2. Dokuların soğuk havan tekniği ile homojenizasyonu

Her bir deneğe ait beyin dokusu hassas terazi ile tartılmış ve sıvı nitrojen kullanılarak soğuk havan tekniği ile fiziksel olarak parçalanmıştır, ardından ELİSA ile uyumlu T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent içinde (w:v=1:20 1ml buffer 20 mg doku örneği için) homojenleştirilmiştir (pH= 7,6). Thermo Scientific Halt™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA Free 78437 eklenmiş (1 mL lizis tamponu başına 10 µL konsantre kokteyl) böylece hücresel proteinlerin endojen proteazlar tarafından bozunmaya karşı korunması



hedeflenmiştir. Soğuk üzerinde 30 dakika süreyle ekstrakte edilmiştir, 4200RPM’de 10 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatantlar ELİSA çalışmalarına hazır hale getirilmiştir.



Resim 3.3. T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent



### 3.2. ELİSA Uygulaması

Enzime bağılı immünosorbent testi (ELİSA-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), immünolojik testler içinde en etkili olanlarındandır. Bu test tekniğı antijenlerin ve antikorların kantitasyonu için basit, hassas, hızlı, güvenilir ve çok yönlü bir tahlil sistemidir. 4 adet ELISA türü vardır:

Doğrudan ELISA (antijen kaplı plaka; tarama antikor)

Dolaylı ELISA (antijen kaplı plaka; tarama antijeni/antikor)

Sandviç ELISA (antikor kaplı plaka; tarama antijeni)

Rekabetçi ELISA (tarama antikor)

Analitik yöntemlerdeki gelişmelerle birlikte, ELISA testi, hassasiyetini artırmak için sürekli olarak optimize edilmiştir ve artık çeşitli biyobelirteçleri saptamak için farklı ELISA türleri mevcuttur.

Araştırmada yüksek hassasiyetli ELİSA Fare Kitleri kullanılarak tüm gruplardan elde edilen kanlarda IL 1 Beta, IL 6, IL 10, IL 22, TNF-alfa ve beyin dokularında NLRP 3 düzeylerine bakılmıştır . Kitler üretici firmanın talimatlarına göre kullanılmıştır. Çalışmamız için hazır kit ekipmanları kullanılmıştır. ELISA kitleri; fare serum, plasma, doku homojenatları, hücre lizatları ve diğer biyolojik sıvı numuneleri ile uyumlu olarak seçilmiştir. Serum pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin biyobelirteçleri; sandviç tipi, Mus Musculus (Mouse) ile uyumlu Cloud Clone (USCN) marka ELISA kitleri kullanılarak araştırılmıştır (Çizelge 1). Standart ve örnekler çift tekrar olarak dikkatli bir şekilde çalışılmıştır. Bir sandviç ELISA'da hedefe özgü proteinin saptanması ve nicelendirilmesi, hedef proteini (antijeni) plakaya sabitleyen ve dolaylı olarak hedef proteinin varlığını saptayan oldukça spesifik antikorlar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu tip yakalama tahliline sandviç tahlili denir çünkü ölçülen analit, her biri antijenin farklı bir epitopunu (yakalama antikor ve saptama antikor) saptayan iki birincil antikor arasında bağlıdır.

Çizelge 3.3. Deneyde kullanılan ELİSA kitleri

|   |                                                                                                                    |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | IL 1Beta Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEA563MU)                                               |
| 2 | IL 6 Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEA079MU)                                                   |
| 3 | IL 10 Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEA056MU)                                                  |
| 4 | IL 22 Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEC032MU)                                                  |
| 5 | Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFA) Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEA133MU)                     |
| 6 | NLR Family, Pridin Domain Containing Protein 3 (NLRP3) Mouse ELISA Kit 96 Test Cloud Clone (USCN) Marka (SEK115MU) |

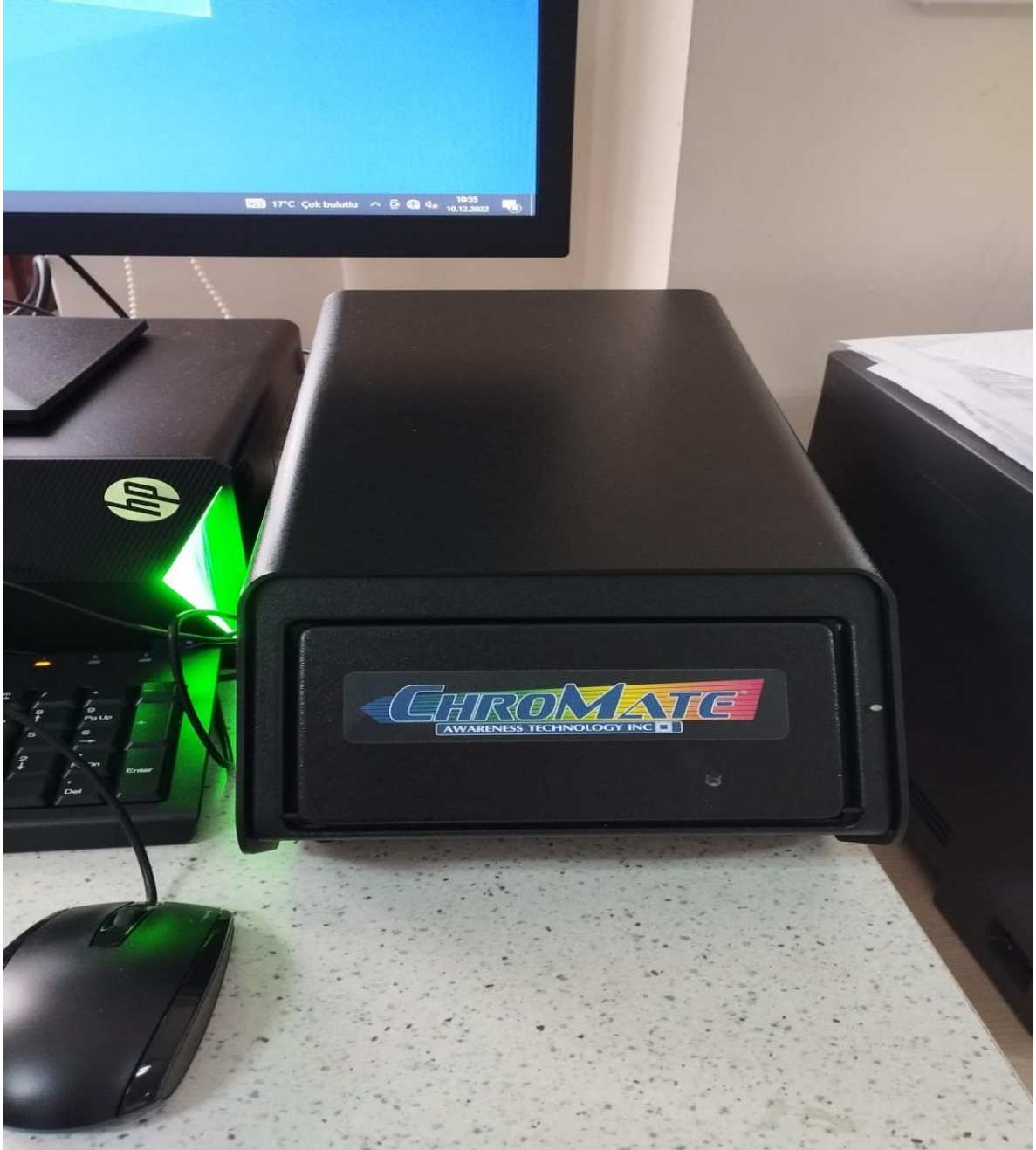
6 kitte de kullanılan çözeltiler ELISA kit prosedüründe belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında analitik saflıkta deiyone su kullanılmıştır. Kit prosedüründe yıkama çözeltisinin 30 kat konsantre olarak verildiği belirtilmiştir. Her kit için yıkama solisyonları 20 ml konsantre yıkama solüsyonu 580 ml deiyonize distile su ile seyreltilmiş ve 600 ml yıkama solisyonu elde edilmiştir. Analiz Prosedüründe kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir ve analiz oda sıcaklığında yapılmıştır. Plakadaki kuyucuklara standartlar ve numuneler her kitte istenilen mikrolitrelerde eklenmiştir. Solisyonların eklenme sırası, yıkama sayıları ve inkübasyon süreleri her kitin prosedürüne uygun olarak ilerletilmiştir. İnkübasyonlarda plakalar sızdırmaz bir film ile örtülmüştür. Son yıkamadan sonra her kuyucuğa TMP (tetrametilbenzidin) eklenerek mavi renk reaksiyonu sağlanmıştır. Bütün kuyucuklarda renk reaksiyonu için aynı sürenin geçmesi sağlanmıştır. Her welle asidik bir stop solisyonu eklendikten sonar rengin maviden sarıya hızla dönüşü gözlemlenmiş, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanılarak her kuyucuğun optik yoğunluğu ölçülmüştür.

ELISA yöntemi ile çalışılan serum ve doku homojenatı konsantrasyonları standart grafiğine göre hesaplanmıştır. Analiz sırasında Combiwash Human marka ELISA plate yıkayıcı ve Chromate marka okuyucu kullanılmıştır.



Resim 3.4. Combiwash Human marka ELISA plate yıkayıcı görüntüsü

ELISA okuyucusu numunelerin absorbanslarını bilgisayar programı ile sonuç olarak vermiştir. Elde edilen sonuçlar Excel programına aktarılmış standartlara göre kitlerde istenilen doğrultuda grafikler oluşturulmuştur. Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrasyonları ile standart eğrisi her kitte istenilen talimatlar doğrultusunda oluşturulmuştur. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonları bu standart eğrisi grafiklerine göre hesaplanmıştır. Ardından elde edilen tüm bu veriler SPSS programına aktarılmıştır.



Resim 3.5. Chromate marka ELİSA okuyucu görüntüsü

### 3.3. Araştırma Verilerinin İstatiksel Analizi

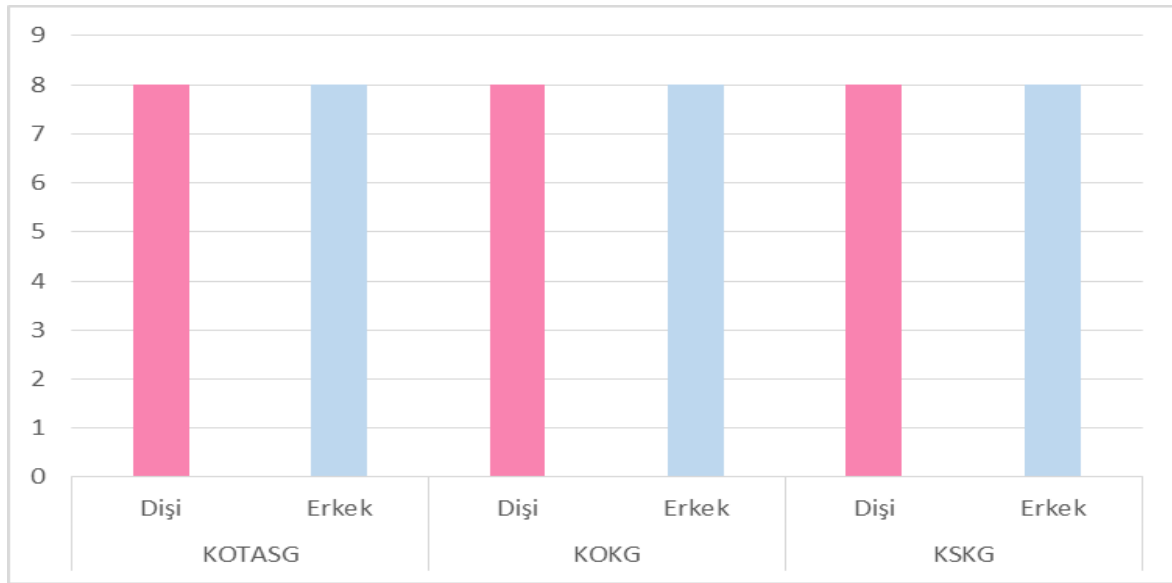
Araştırmanın istatistiksel analizi SPSS 25.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler, frekans dağılımı ve yüzde olarak Çizelge şeklinde sunulmuştur. Sürekli değişkenler dağılım yapılarına göre ortanca (Median), çeyreklikler arası aralık (IQR) ile kategorik değişkenler ise sayı ve yüzdeler ile belirtilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov - Smirnov testi ve histogram dağılım grafikleri ile değerlendirilmiş

olup normal dağılım göstermeyen durumlar için parametrik olmayan istatistiksel yöntemlerden yararlanılmıştır. İstatistiksel yöntem olarak kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson Ki Kare, Yates düzeltilmeli Ki Kare, Fisher Ki Kare testleri uygulanmıştır. İki bağımsız grup arasındaki farkları incelemek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Non parametric dağılım gösteren ikiden fazla grup için ( $k > 2$ ) Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenlerin kendi aralarında ilişkilerinin değerlendirilmesi için Spearman korelasyon testi uygulanmıştır.



#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza N=48 adet C57BL/6 yavru fare dâhil edilmiştir. Otizmlili fareler embriyonik dönemin 12,5. gününde gebe farelere VPA uygulanması ile elde edilmiştir ve hayvanların davranışları OFT, EPM, MCT, TCT olmak üzere 4 farklı davranış deneyi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamız için 3 grup oluşturulmuştur; Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu (KOTASG), Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG), Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG). KOTASG grubuna genel anestezi altında transaurikular vagus sinir stimülasyonu uygulanmıştır. Her grup 8 dişi, 8 erkek yavru olmak üzere 16 yavru ile eşit sayılarda oluşturulmuştur. Araştırmamız 24 dişi yavru fare (%50) ve 24 erkek yavru fare (%50) ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmamızda 32 (%66,6) adet otistik davranış gösteren C57BL/6 yavru fare ve 16 (%33,3) adet C57BL/6 sağlıklı yavru fare kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Araştırmaya katılan bireylerin cinsiyet dağılımı

Araştırmamızda dişi ve erkek denekler arasında serum TNF-alfa seviyesi bakımından anlamlı farklılık bulunmuştur  $p=0,012$  ( $p<0,05$ ). Serum IL 1Beta, IL 6, IL 10 ve IL 22 seviyeleri bakımından dişi ve erkek tüm denekler arasında bir farklılık gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1. Serumda incelenen parametrelerin (pg/ml) tüm dişi ve erkek denekler arasında belirlenen median ve p değerleri

| Parametreler         | Dişi<br>Median ( IQR )       | Erkek<br>Median ( IQR )      | p             |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| IL 1 Beta<br>(pg/ml) | 533,48<br>(516,54-565,06)    | 530,83<br>(511,40-551,98)    | 0,757         |
| IL 6<br>(pg/ml)      | 447,84<br>(438,97-462,48)    | 453,16<br>(435,42-474,47)    | 0,415         |
| IL 10(pg/ml)         | 1260,00<br>(1093,05-1410,80) | 1303,35<br>(1115,80-1512,52) | 0,536         |
| IL 22<br>(pg/ml)     | 1053,14<br>(980,43-1147,65)  | 1115,45<br>(1007,44-1185,03) | 0,279         |
| TNF Alfa<br>(pg/ml)  | 885,20<br>(867,00-930,65)    | 955,50<br>(910,72-998,05)    | <b>*0,012</b> |

*\* $p < 0,05$  anlamlı fark var,  $p > 0,05$  anlamlı fark yok. Elde edilen verilerimiz normal dağılım göstermediğinden non parametrik test kullanılmış ve Median değerleri ile sunulmuştur. IL 1 Beta: interlökin 1 Beta, IL 6: İnterlökin 6, IL 10: İnterlökin 10, IL 22: İnterlökin 22, TNF Alfa: Tümör Nekroz Faktör Alfa. Median: Ortanca, IQR: Interquartile Range (%25-75)*

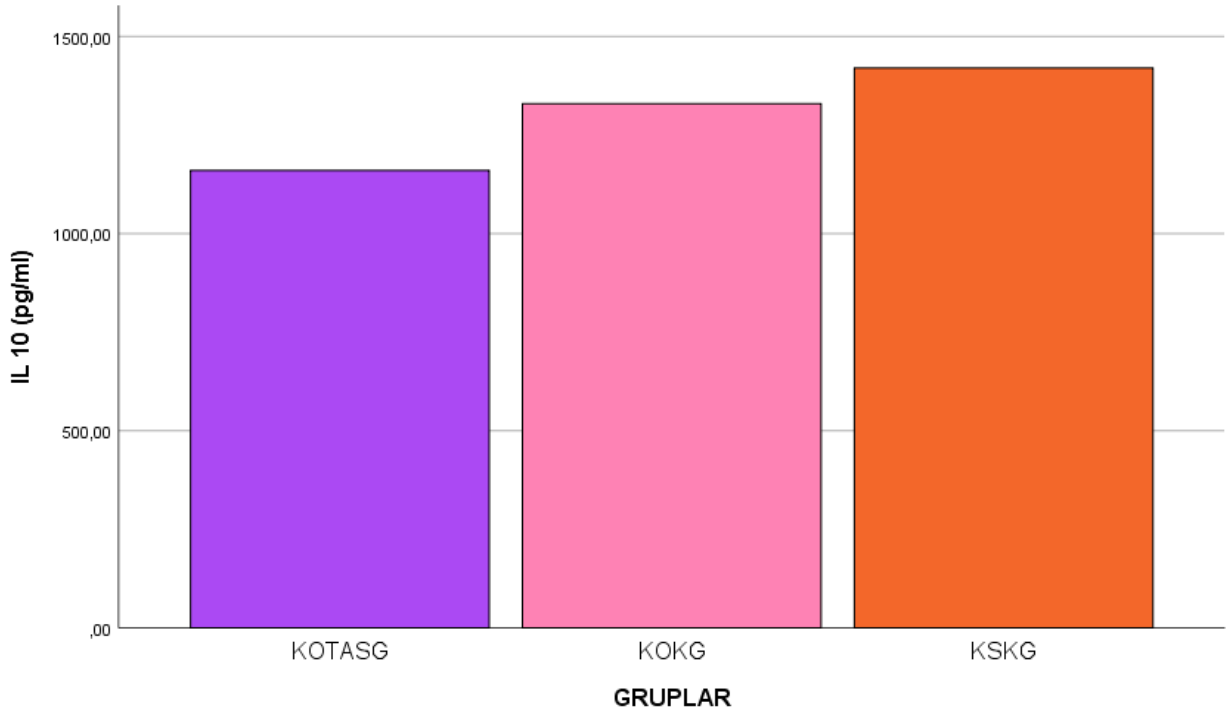
Beyin dokusundan elde edilen homojenatta incelenen NLRP 3 (ng/ml) seviyesi bakımından dişi (M=1,29) ve erkek (M=1,40) denekler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir  $p=0,503$ .

KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında IL1 Beta seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat gruplar ikili olarak kıyaslandığında KOTASG- KSKG arasında IL 1 Beta seviyesi anlamlı olarak farklı bulunmuştur  $p=0,010$  ( $p < 0,05$ ).

KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında IL 6 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

KOTASG, KOKG ve KSKG olarak 3 grup birbiri ile kıyaslandığında IL10 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur  $p=0,024$  ( $p < 0,05$ ). Daha sonra yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG ve KOKG olduğu saptanmıştır  $p=0,014$  ( $p < 0,05$ ). KOTASG-KSKG ve KOKG-KSKG karşılaştırıldığında IL 10 seviyesi bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.





Şekil 4.2. Grupların IL 10 (pg/ml) bakımından karşılaştırılması

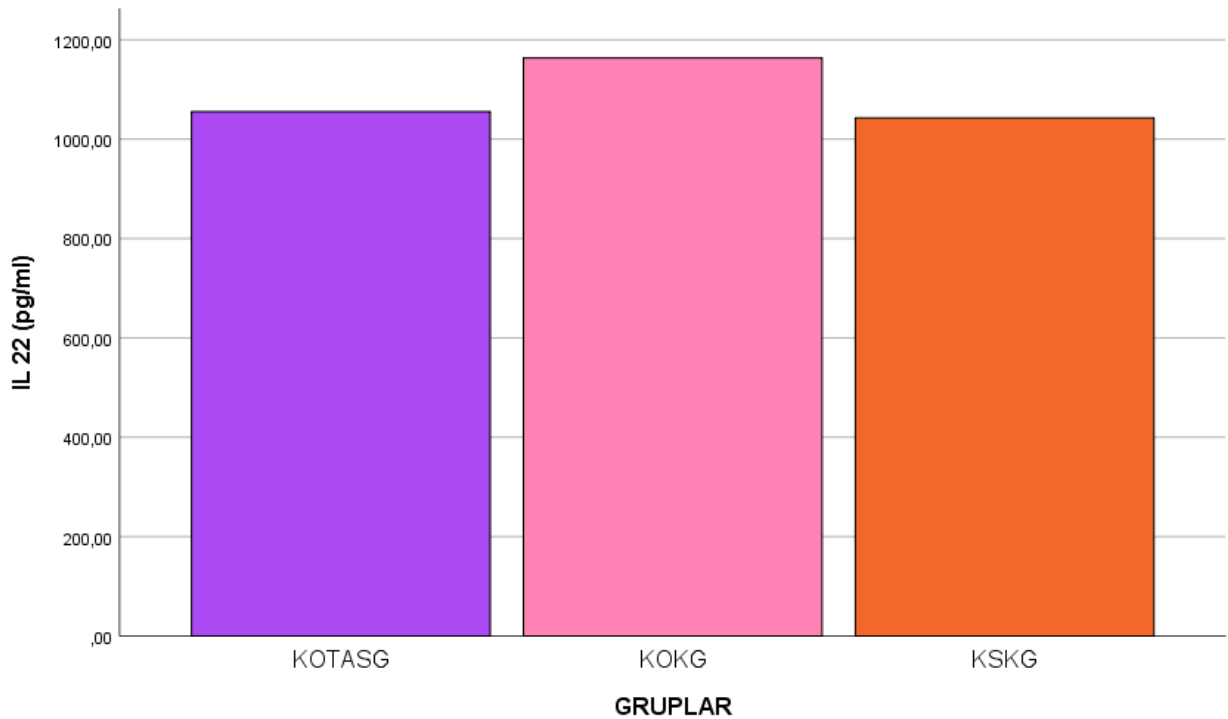
KOTASG, KOKG ve KSKG olarak 3 grup birbiri ile kıyaslandığında IL22 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur  $p=0,013$  ( $p<0,05$ ). Daha sonra yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG ve KOKG olduğu saptanmıştır  $p=0,006$  ( $p<0,05$ ). KOTASG-KSKG ve KOKG-KSKG karşılaştırıldığında IL 22 seviyesi bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Her grupta kendi içinde dişi ve erkek denekler IL 22 seviyesi bakımından değerlendirildiğinde; KOTASG grubunda dişi ve erkek denekler arasında IL 22 seviyesi bakımından anlamlı farklılık bulunmuştur  $p=0,038$  ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.2. İncelenen serum parametrelerinin her grupta dişi ve erkek denekler açısından p değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar              | IL 1 Beta | IL 6    | IL 10   | IL 22    | TNF Alfa |
|----------------------|-----------|---------|---------|----------|----------|
| KOTASG<br>Dişi-Erkek | P=0,372   | P=0,793 | P=0,599 | *P=0,038 | P=0,083  |
| KOKG<br>Dişi-Erkek   | P=0,207   | P=0,371 | P=0,529 | P=0,916  | P=0,189  |
| KSKG<br>Dişi-Erkek   | P=0,115   | P=0,833 | P=0,401 | P=0,916  | p=0,092  |

\* $p < 0,05$  anlamlı fark var,  $p > 0,05$  anlamlı fark yok. . IL 1 Beta: interlökin 1 Beta, IL 6: İnterlökin 6, IL 10: : İnterlökin 10, IL 22: : İnterlökin 22, TNF Alfa: Tümör Nekroz Faktör Alfa

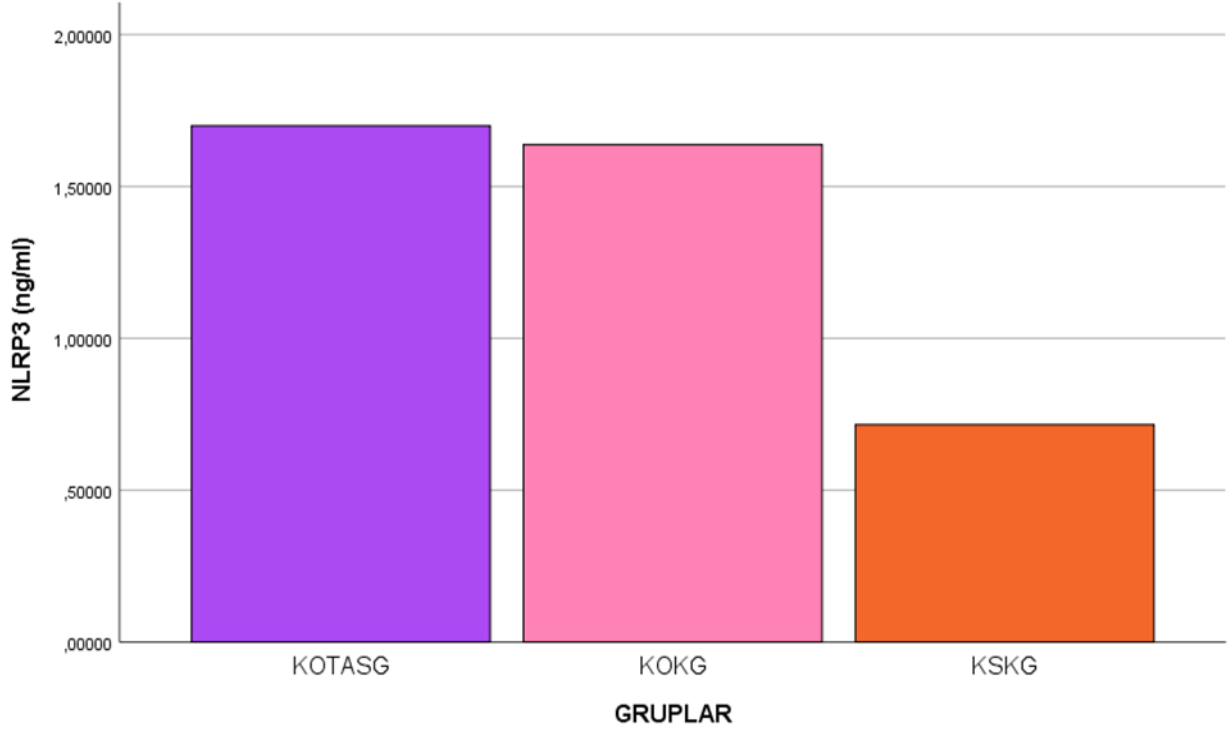


Şekil 4.3. Grupların IL 22 (pg/ml) bakımından karşılaştırılması

KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında TNF Alfa seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında NLRP 3 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. ( $p < 0,05$ ). Daha sonra yapılan

post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG – KSKG ve KOKG- KSKG arasında olduğu saptanmıştır  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.4. Grupların NLRP 3 (ng/ml) bakımından karşılaştırılması

Çizelge 4.3. Serumda incelenen parametrelerin (pg/ml) gruplara göre median değerleri

| Parametre            | KOTASG<br>Median ( IQR )                                                                        | KOKG<br>Median ( IQR )                                                                          | KSKG<br>Median ( IQR )                                                                         | p      |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| IL 1 Beta<br>(pg/ml) | 521,68<br>(511,40-535,97)<br>Dişi: 525,11 (513,68-541,69)<br>Erkek:515,97(502,82-531,97)        | 533,12<br>(510,25-575,98)<br>Dişi: 517,11 (510,25-560,55)<br>Erkek: 557,12 (515,97-613,71)      | 541,70<br>(528,54-574,06)<br>Dişi: 556,70 (536,25-585,70)<br>Erkek:530,83 (514,25-549,69)      | 0,061  |
| IL 6<br>(pg/ml)      | 449,61<br>(438,97-462,48)<br>Dişi: 447,84 (438,97-462,48)<br>Erkek: 449,61 (433,20-447,57)      | 454,94<br>(438,08-478,46)<br>Dişi: 448,73 (430,09-473,57)<br>Erkek: 470,92 (440,30-493,10)      | 447,84<br>(435,42-457,60)<br>Dişi: 446,42 (436,25-472,40)<br>Erkek: 448,73 (435,42-457,60)     | 0,613  |
| IL 10<br>(pg/ml)     | 1160,25<br>(1075,72-1267,60)<br>Dişi:1175,40(1089,82-1267,60)<br>Erkek:1116,10(1052,92-1312,02) | 1329,35<br>(1183,05-1515,80)<br>Dişi:1281,65(1104,97-1528,77)<br>Erkek:1353,20(1206,90-1515,80) | 1419,80<br>(1153,77-1501,97)<br>Dişi:1370,00(116,87-1468,15)<br>Erkek:1459,45(1153,77-1874,62) | *0,024 |
| IL 22<br>(pg/ml)     | 1055,22<br>(965,90-1115,45)<br>Dişi:982,51 (952,39-1081,18)<br>Erkek:1115,45(1010,56-1154,92)   | 1163,22<br>(1039,64-1300,32)<br>Dişi:1140,38(1024,06-1337,71)<br>Erkek:1171,53(1057,29-1251,50) | 1042,75<br>(975,24-1145,57)<br>Dişi:1067,41(931,46-1145,57)<br>Erkek:1030,29(975,24-1150,76)   | *0,013 |
| TNF Alfa<br>(pg/ml)  | 893,70<br>(844,75-952,25)<br>Dişi: 870,30(784,07-911,77)<br>Erkek: 923,50(869,25-1065,07)       | 925,65<br>(884,15-998,05)<br>Dişi: 900,10(870,27-972,52)<br>Erkek: 968,25(907,57-1021,50)       | 923,50<br>(883,02-979,97)<br>Dişi:895,80(871,12-981,72)<br>Erkek:955,50(922,45-979,97)         | 0,312  |

\* $p < 0,05$  anlamlı fark var,  $p > 0,05$  anlamlı fark yok. Elde edilen verilerimiz normal dağılım göstermediğinden non parametrik test kullanılmış ve Median değerleri ile sunulmuştur. IL 1 Beta: interlökin 1 Beta, IL 6: İnterlökin 6, IL 10 : İnterlökin 10, IL 22: İnterlökin 22, TNF Alfa: Tümör Nekroz Faktör Alfa. KOTASG: Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu, KOKG: Kronik Otistik Kontrol Grubu, KSKG: Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu. Median: Ortanca, IQR: Interquartile Range (%25-75)

Çizelge 4.4 Beyin dokusunda incelen NLRP 3'ün (ng/ml) gruplara göre median değerleri

| Parametre         | KOTASG<br>Median ( IQR ) | KOKG<br>Median ( IQR ) | KSKG<br>Median ( IQR ) | p     |
|-------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NLRP 3<br>(ng/ml) | 1,69<br>(1,29-2,10)      | 1,63<br>(1,40-1,86)    | 0,71<br>(0,50-0,92)    | *0,00 |

\* $p < 0,05$  anlamlı fark var,  $p > 0,05$  anlamlı fark yok. NLRP 3: NLR Family Pyridin Domain Containing Protein 3. KOTASG: Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu, KOKG: Kronik Otistik Kontrol Grubu, KSKG: Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu. Median: Ortanca, IQR: Interquartile Range (%25-75)

Ardından incelenen bu parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonu değerlendirilmiştir. Korelasyon katsayısına bakarak pozitif mi yoksa negatif mi korele olduğu değerlendirilmiştir. IL 1 Beta; IL 6, IL 10 ve IL 22 ile pozitif korele (ele alınan değişkenlerin aynı yönde artması ya da azalması) bulunmuştur fakat TNF Alfa ve NLRP 3 ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

IL 6; IL 1Beta, IL 10, IL 22 ile pozitif korele bulunmuştur fakat TNF Alfa ve NLRP 3 ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

IL 10; IL 1 Beta, IL 6, IL 22 ve TNF Alfa ile pozitif korele bulunmuştur. NLRP 3 ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

IL 22; IL 1 Beta, IL 6, IL 10 ve TNF Alfa, NLRP 3 ile pozitif korele bulunmuştur.

TNF Alfa; IL 10 ve IL 22 ile pozitif korele bulunmuştur. IL 1Beta, IL 6 ve NLRP 3 ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

NLRP 3; IL 22 ile pozitif korele bulunmuştur. IL 1Beta, IL 6, IL 10, TNF Alfa ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

Çizelge 4.5. Beyin ve Serum örneklerinde incelenen parametrelerin birbiri ile ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları

| Parametreler         | IL 1<br>Beta | IL 6  | IL 10  | IL 22 | TNF<br>Alfa | NLRP 3<br>(ng/ml) |
|----------------------|--------------|-------|--------|-------|-------------|-------------------|
| IL 1 Beta<br>(pg/ml) | 1,000        | 0,493 | 0,559  | 0,426 | 0,264       | -0,284            |
| IL 6<br>(pg/ml)      | 0,493        | 1,000 | 0,538  | 0,623 | 0,206       | 0,069             |
| IL 10<br>(pg/ml)     | 0,559        | 0,538 | 1,000  | 0,592 | 0,320       | -0,219            |
| IL 22<br>(pg/ml)     | 0,426        | 0,623 | 0,592  | 1,000 | 0,344       | 0,294             |
| TNF Alfa<br>(pg/ml)  | 0,264        | 0,206 | 0,320  | 0,344 | 1,000       | -0,42             |
| NLRP 3<br>(ng/mL)    | -0,284       | 0,69  | -0,219 | 0,294 | -0,42       | 1,000             |

Korelasyon kat sayısı güç düzeyleri;  $0 < r < 0,24$  zayıf,  $0,25 < r < 0,49$  orta,  $0,50 < r < 0,74$  güçlü,  $0,75 < r < 0,99$  çok güçlü korele; Nonparametric Corellation

| Correlations   |          |                         | İL_1BETA | İL_6   | İL_10  | İL_22  | TNF_ALFA | NLRP3 |
|----------------|----------|-------------------------|----------|--------|--------|--------|----------|-------|
| Spearman's rho | İL_1BETA | Correlation Coefficient | 1,000    | ,493** | ,559** | ,426** | ,264     | -,284 |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | .        | ,000   | ,000   | ,003   | ,070     | ,051  |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |
|                | İL_6     | Correlation Coefficient | ,493**   | 1,000  | ,538** | ,623** | ,206     | ,069  |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | ,000     | .      | ,000   | ,000   | ,160     | ,640  |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |
|                | İL_10    | Correlation Coefficient | ,559**   | ,538** | 1,000  | ,592** | ,320*    | -,219 |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | ,000     | ,000   | .      | ,000   | ,027     | ,135  |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |
|                | İL_22    | Correlation Coefficient | ,426**   | ,623** | ,592** | 1,000  | ,344*    | ,294* |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | ,003     | ,000   | ,000   | .      | ,017     | ,043  |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |
|                | TNF_ALFA | Correlation Coefficient | ,264     | ,206   | ,320*  | ,344*  | 1,000    | -,042 |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | ,070     | ,160   | ,027   | ,017   | .        | ,778  |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |
|                | NLRP3    | Correlation Coefficient | -,284    | ,069   | -,219  | ,294*  | -,042    | 1,000 |
|                |          | Sig. (2-tailed)         | ,051     | ,640   | ,135   | ,043   | ,778     | .     |
|                |          | N                       | 48       | 48     | 48     | 48     | 48       | 48    |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Resim 4.1. Beyin (NLRP 3) ve Serum örneklerinde incelenen parametrelerin birbiri ile korelasyon ilişkisini gösteren p değerleri \* $p < 0,05$  anlamlı fark var,  $p > 0,05$  anlamlı fark yok. Sig. (2-tailed) = p

Çizelge 4.6. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin birbiri ile olan korelasyon ilişkisi

| Parametreler         | IL 1<br>Beta                                    | IL 6                                            | IL 10                                           | IL 22                                           | TNF<br>Alfa                                    | NLRP 3<br>(ng/ml)                              |
|----------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| IL 1 Beta<br>(pg/ml) | .                                               | 0,493<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | 0,559<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | 0,426<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | x                                              | x                                              |
| IL 6<br>(pg/ml)      | 0,493<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | .                                               | 0,538<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | 0,623<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | x                                              | x                                              |
| IL 10<br>(pg/ml)     | 0,559<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | 0,538<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | .                                               | 0,592<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | 0,320<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05 | x                                              |
| IL 22<br>(pg/ml)     | 0,426<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | 0,623<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | 0,592<br>Pozitif<br>(güçlü)<br>Korele<br>P<0,05 | .                                               | 0,344<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05 | 0,294<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05 |
| TNF Alfa<br>(pg/ml)  | x                                               | x                                               | 0,320<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | 0,344<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | .                                              | x                                              |
| NLRP 3<br>(ng/mL)    | x                                               | x                                               | x                                               | 0,294<br>Pozitif<br>(orta)<br>korele<br>P<0,05  | x                                              | .                                              |

\* $p<0,05$  anlamlı fark var,  $p>0,05$  anlamlı fark yok. Korelasyon kat sayısı güç düzeyleri;  
 $0<r<0,24$  zayıf,  $0,25<r<0,49$  orta,  $0,50<r<0,74$  güçlü,  $0,75<r<0,99$  çok güçlü korele;  
 Nonparametric Corellation



Çizelge 4.7. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOTASG ve KOKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri

| Parametreler     | IL 1<br>Beta | IL 6  | IL 10 | IL 22 | TNF<br>Alfa | NLRP 3 |
|------------------|--------------|-------|-------|-------|-------------|--------|
| KOTASG/KOKG<br>p | 0,239        | 0,402 | 0,014 | 0,06  | 0,224       | 1      |

KOTASG: Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu, KOKG: Kronik Otistik Kontrol Grubu (3 grubun ikili analizi olduğu için  $p < 0,05/3 = 0,0166$  anlamlı kabul edilmiştir)

Çizelge 4.8. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOTASG ve KSKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri

| Parametreler     | IL 1<br>Beta | IL 6  | IL 10 | IL 22 | TNF<br>Alfa | NLRP 3 |
|------------------|--------------|-------|-------|-------|-------------|--------|
| KOTASG/KSKG<br>p | 0,010        | 0,809 | 0,023 | 0,926 | 0,171       | 0,00   |

KOTASG: Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu, KSKG: Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (3 grubun ikili analizi olduğu için  $p < 0,05/3 = 0,0166$  anlamlı kabul edilmiştir)

Çizelge 4.9. Beyin ve serumda incelenen parametrelerin KOKG ve KSKG grupları kıyaslandığında elde edilen p değerleri

| Parametreler | IL 1<br>Beta | IL 6  | IL 10 | IL 22 | TNF<br>Alfa | NLRP 3 |
|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------------|--------|
| KOKG/KSKG    | 0,491        | 0,423 | 0,696 | 0,017 | 0,926       | 0,00   |
| p            |              |       |       |       |             |        |

KOKG: Kronik Otistik Kontrol Grubu, KSKG: Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (3 grubun ikili analizi olduğu için  $p < 0,05/3 = 0,0166$  anlamlı kabul edilmiştir)

Beyin ve serumda incelenen parametrelerin birbiri ile olan korelasyon ilişkisi her grubun kendi içinde ayrı ayrı değerlendirildiğinde;

KOTASG grubunda IL 1 Beta ve IL 10 pozitif güçlü korele ( $p=0,003$ ) (korelasyon katsayısı=0,694) bulunmuştur. IL 22 ile TNF Alfa ( $p=0,001$ ) (korelasyon katsayısı=0,730) ile pozitif güçlü korele ve NLRP 3 ile ( $p=0,03$ ) (korelasyon katsayısı=0,543) pozitif güçlü korele bulunmuştur.

KOKG grubunda IL 1 Beta; IL 6( $p=0,00$ ) (korelasyon katsayısı=0,873) ile çok güçlü korele , IL 10 ( $p=0,024$ ) (korelasyon katsayısı=0,560) ve IL 22 ( $p=0,022$ ) (korelasyon katsayısı=0,567) ile pozitif güçlü korele bulunmuştur.

KSKG grubunda IL 6; IL 10 ( $p=0,002$ ) (korelasyon katsayısı=0,721) ile pozitif güçlü korele, IL 22 ( $p=0,00$ ) (korelasyon katsayısı=0,881) ile pozitif çok güçlü korele ve TNF Alfa ( $p=0,025$ ) (korelasyon katsayısı=0,556) ile pozitif güçlü korele bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamız otizimli hayvan modeli üzerinde C57BL/6 gebe farelere embriyonik dönemde VPA uygulayarak gerçekleştirilmiştir. Türlerin arasındaki farklılık nedeni ile kullanılan model otizmin anlaşılmasında ne kadar önemli olsada insanı tam olarak yansıtamamaktadır. OFT, EPM, MCT, TCT olmak üzere 4 farklı davranış deneyi ile de hayvanların davranış deneyleri sağlanmıştır böylece VPA ile oluşturduğumuz otizm modelinin bir sağlaması da yapılmaya çalışılmıştır. KOTASG grubuna genel anestezi altında transaurikular vagus sinir stimülasyonu uygulanmıştır. Seçtiğimiz bu modelde, VNS'nin insan cevabını daha yakın simüle etmeye yarar sağlaması göz önünde bulundurulmuştur. C57BL/6 fareler daha saf bir ırktır ve otizm modelini yansıtmaya amacıyla sahada yaygın olarak kullanılmaktadır bu nedenle araştırmamızda tercih edilmiştir. İnflamasyon otizmin hem etiyolojisinde hem de potansiyel biyobelirteç arayışında önemli bir yere sahip olduğu için araştırmamızda üç grubunda kan ve beyin dokularını kullanarak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler ELİSA yöntemi ile incelenmiştir. Kanlarda IL 1 Beta, IL 6, IL 10, IL 22, TNF-alfa ve beyin dokularında NLRP 3 düzeylerine bakılmıştır.

Genetik manipülasyon, patojenik üreme, stres modelleri, otizm ile ilişkili beyin zonlarına müdahale (örneğin BTBR modeli), propiyonik asit modeli, CRISPR modeli, inflamasyon modelleri (örneğin MIA), LPS kaynaklı otizm modeli gibi çok farklı modeller ile otistik hayvan modelleri oluşturulmaktadır [15, 91-94]. Çoğu çalışma otizmi indüklemek için gebelikte veya doğum sonrası dönemde valproik asit (VPA) kullanır, beyin gelişiminin farklı aşamalarında VPA'ya maruz kalma otizm benzeri davranışları tetikler [91]. VPA modeli kimyasal bir model olması sebebi ile başarı oranı yüksek bir otizm modelidir. Bu nedenle araştırmamızda VPA modeli kullanılmıştır. Fakat B ve C planı olarak sahada yaygın kullanımı olan iki ayrı stres modeli yedek plan olarak ön görülmüştür. B planı; Prenatal stres modellerinin uygulanması; 36 saat sabit ışık, 8 saat sosyal izolasyon, 3 saat talaşsız kafes, gece boyu 45 derecelik kafes eyimi, çoklu kafes değişikliği gibi ve C planı; parlak ışık ve plastik tutucu modeli ile gebe farelere stres uygulamak şeklindedir. C57BL/6 tip fareler otizm modeli sağlanan literatürde yaygın yer alan farelerdir, bu farelerin temininde bir sorun gerçekleşirse aynı modeli farklı tip fareler ve ratlar ile de sağlamak mümkündür yedek plan olarak bunlarda göz önüne alınmıştır. Literatürde bu konuda pek çok örnek çalışma yer almaktadır [188, 189].

VNS tedavisi ilk kez 1988 yılında hastalara verilmiştir, 1994 yılında dirençli epilepsi hastalarında ek bir tıbbi tedavi olarak onaylanmıştır [190].

VS, nükleus traktus solitarius (NTS) aracılığı ile talamus, amigdala ve ön-beyin ile medüller retiküler formasyon yolu ile de beynin diğer kortikal alanları ile etkileşir. Vagus sinirinin uyarılması, merkezi sinir sistemindeki norepinefrinin birincil kaynağı olan locus coeruleus'ta güçlü, fazik nöral aktiviteyi harekete geçirir, hipokampus ve kortekste norepinefrin düzeylerini artırır. Ek olarak, VNS, BDNF düzeylerini önemli ölçüde artırır [107, 191]. Vagus sinir stimülasyonunun etkinliği uzun sürelidir nöroepinefrin tarafından üretilen etkilere, locus coeruleus'un bütünlüğüne ve plastisiteye bağlıdır. Merkezi sinir sistemindeki nöromodülatör merkezlerin aktivasyonuna ek olarak, VNS, otonom sinir sisteminin parasempatik dalının eş zamanlı aktivasyonunu sağlar. Vagus siniri, iç organları innerve eden parasempatik liflerin büyük bir kısmından oluşur. Parasempatik aktivasyon, “dinlen ve sindir” fizyolojik tepkileri ile ilişkilidir ve vagus siniri, sakin davranış durumlarına geçişe aracılık eden bilgileri taşır. Bununla tutarlı olarak, hastalarda yapılan bir çalışma, VNS'nin anksiyete ölçümlerinde bir azalma sağladığını göstermektedir [192, 193].

VNS, otizmlili bireyler için potansiyel bir yardımcı tedavi olarak görülmektedir. VNS, tedaviye dirençli epilepsi ve depresyonun şiddetini azaltmak için kullanılan FDA onaylı bir tedavidir. Çok sayıda çalışma, VNS tedavisinin güvenli olduğunu ve yetişkinlerin yanı sıra 6 aylıktan küçük çocuklara minimum yan etkilerle verilebileceğini belgelemiştir [107]. Araştırmacılar otistik deneklerin serum ve beyin omurilik sıvısında artan inflamatuvar sitokinleri ve sitokin dengesizliklerini, bozulmuş biliş ve davranışlar ile ilişkilendirmektedir. VNS sitokinler üzerine etkileri sebebi ile uzmanlar tarafından otizm için potansiyel bir tedavi olarak görülmektedir [8, 194, 195].

VNS'nin otizmdeki davranışsal etkileri sorununu en doğrudan ele alan çalışmalardan biri Tsimerinov ve arkadaşları tarafından 2014 yılında gerçekleştirilen ve yalnızca konferans özeti olarak yayınlanan retrospektif bir vaka serisidir. Rakamlar küçük olsa da (12 hasta) sonuçlar (davranışsal iyileşme gösteren 11 hasta) cesaret vericidir. Hull ve arkadaşları tarafından 2015'de sunulan vaka raporunda otizmlili 10 yaşında bir çocuğun VNS ile nöbet kontrolünde başlangıçtaki iyileşmenin sürdürülemediği, ancak bir yıl boyunca “saldırgan davranışın kontrolünde kayda değer iyileşme” sağlandığı bildirilmiştir [108, 196].

Wang ve arkadaşları tarafından Pekin’de üç pediatrik epilepsi merkezinden araştırmaya dâhil edilen ve ilaca dirençli epilepsisi olan 10 otizimli çocuk ile gerçekleştirilen çalışmada; stabil vagus sinir stimülasyonunun etkinliğinin otistik davranışlar üzerine etkileri gözlemsel olarak incelenmiştir. VNS parametreleri 6 çocukta nöbet üzerine etkide iyi sonuç vermiştir. Ayrıca bazı çocukların otistik davranışlarında iki takip arasında önemli gelişmeler gözlenmiştir [197].

ASD’li bireylerde VNS tedavisiyle ilgili bugüne kadar yapılmış en büyük çalışmalardan biri Levy ve arkadaşları tarafından Kaliforniya’da gerçekleştirilmiştir, araştırmaya göre otizimli ve otizmi olmayan bireyler arasında nöbet azalması benzerdir. Veriler, VNS cihazının 1997 yılında ABD FDA tarafından onaylanmasından sonra kurulan VNS tedavisi hasta sonuç kayıt defterinden elde edilmiştir. İki kohort karşılaştırılmıştır: 1) kayıta izlenen epilepsisi olan ancak ASD’si olmayan (ASD olmayan [NASD] Grup, 315 hasta) hastalar ve 2) VNS cihazı implantasyonu yapılan ASD tanılı hastalar (ASD Grubu, 77 hasta). 12 aylık VNS tedavisinden sonra, otizmi olmayan bireylerin %56’sı nöbetlerde bir azalma yaşarken, otizimli bireylerin % 62’sinin nöbetlerde bir azalma yaşadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, otizimli bireyler, ASD’si olmayan bireylere kıyasla 12 aylık VNS tedavisinin ardından ruh halinde önemli ölçüde daha fazla iyileşme yaşadıkları belirlenmiştir [198].

Vagus sinirinin uyarılmasının sosyal bilişi nasıl geliştirebildiğini kanıtlamakta, VNS uygulama temelli araştırmalar önemli bir yere sahiptir. Beyin hastalıklarında VNS'nin faydalı etkilerinin altında yatan biyolojik mekanizmalar henüz sadece kısmen açıklığa kavuşturulmuştur [199].

Enflamasyon normalde yerel ve geçici bir olaydır ve ortadan kalktıktan sonra immün ve fizyolojik homeostaz yeniden sağlanır. Bununla birlikte, doğuştan gelen bağışıklık düzenlemesinin bozulması, sürekli proinflatuar sitokin aktivitesine ve aşırı veya kronik iltihaplanmaya neden olabilir. VN, enfeksiyona/enflamasyona karşı önemli bir birinci basamak doğal savunma sağlayan ve vücuttaki homeostazın yeniden sağlanmasına yardımcı olan koordineli nöral, davranışsal ve endokrin yanıtlarda yer alan nöroendokrin-bağışıklık ekseninin önemli bir bileşenidir. Vagus siniri ve inflamatuvar refleks, bağışıklık sistemi ve metabolizmayı birbirine bağlar [200]. Vagus siniri inflamatuvar iltihaplanma için bir sinyal aldığı anda (sitokin aracılı) beyni uyarır ve vücudun bağışıklık yanıtını düzenler. Vagal stimülasyon, nöroinflamasyon özelliği gösteren depresyon da dâhil olmak üzere inflamatuvar

hastalıkları tedavi etmek için umut vadetmektedir. Vagus sinirinin enflamatuar refleksi, makrofajlardan aşırı sitokin salınımını önler [201]. Bununla birlikte inflamasyonu modüle etmede efferent vagus sinir sinyalinin rolü hakkında nispeten az şey bilinmektedir [202]. Yaklaşık 20 yıl önce vagus sinirinin proinflamatuar sitokin düzeylerini ve inflamasyonu düzenlediği keşfedilmiştir. VNS'nin, çoklu inflamatuvar bozukluklarda proinflamatuar sitokinlerde koruyucu bir azalmaya neden olduğunu ortaya çıkaran çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, sitokin seviyeleri, etkili bir bağışıklık tepkisinin yalnızca tek bir yönüdür. Vagus siniri stimülasyonunun ek mekanizmalar yoluyla inflamasyonu düzenlediği düşünülmektedir. Sitokin seviyelerindeki değişikliklerin ötesinde inflamasyonu tedavi etmede VNS önemli bir potansiyele sahip görünmektedir. Biriken kanıtlar, bağışıklık süreçlerinin ASD'nin patofizyolojisinde anahtar bir rol oynadığını göstermektedir [142, 203]. Periferik inflamasyon psikiyatrik durumların etiyolojisine katkıda bulunduğundan, inflamasyonun zayıflatılmasının otizmle ilişkili semptomları azaltabileceği öngörülmektedir [204]. Proinflamatuar sitokinlerin özellikle TNF Alfa'nın otizmli bireylerde arttığını gösteren araştırmalar mevcuttur, çoğu araştırmacı otistik deneklerde artan bu iflamatuvar sitokinleri bozulmuş biliş ve davranışlar ile ilişkilendirmektedir ve VNS'nin olumlu etkileri sitokin aracılı mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir [8, 141].

Çalışmamızda vagus sinir stimülasyonu serumda incelenen sitokinler arasında üç grup birbiri ile kıyaslandığında, iki ayrı parametrede IL 10 ve IL 22'de anlamlı farklılık yaratmıştır. IL 1Beta seviyesinde ise KOTASG ve KSKG olmak üzere iki grup birbiri ile kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlenmiştir  $p=0,010$  ( $p<0,05$ ). Ayrıca beyin dokusunda incelediğim NLRP 3 de stimülasyon grubunda diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). IL 10 seviyesi için daha sonra yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG  $M=1160,25$  (1075,72-1267,60) ve KOKG  $M=1329,35$  (1183,05-1515,80) olduğu saptanmıştır  $p=0,014$  ( $p<0,05$ ). IL 22 seviyesi için daha sonra yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG  $M=1055,22$  (965,90-1115,45) ve KOKG  $M=1163,22$  (1039,64-1300,32) olduğu saptanmıştır  $p=0,006$  ( $p<0,05$ ). KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında NLRP 3 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. ( $p<0,05$ ), yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG – KSKG ve KOKG- KSKG arasında olduğu belirlenmiştir  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ). Araştırmamız VNS'nin incelediğimiz 6 sitokin içerisinde IL 1 Beta, IL 10, IL 22 ve NLRP 3 üzerinde anlamlı farklılıklar yarattığını göstermektedir.

Otizimde immün disfonksiyon tanımlanmıştır ancak bu durumun otizmin başlamasına katkıda bulunup bulunmadığı ya da bir sonucu olup olmadığı henüz açık değildir. Otizmin altında yatan kesin patofizyolojiler belirsiz olsa da, artan kanıtlar düzensiz nöroinflamasyonun rolünü desteklemektedir. Nöroinflamasyon, glial hücrelerin (astrozitler ve mikroglia) sürekli aktivitesi ve proliferasyonu ile karakterize edilir; yaralanma, enfeksiyon veya hastalıktan sonra ortaya çıkar ve beyin fonksiyonlarını etkiler. Hem ASD'li bireylerde ölüm sonrası araştırılan dokularda hem de hayvan modellerinde artan sayıda reaktif mikroglial ve astrosit rapor edilmiştir. Mikroglia ve astrositler arasındaki çift yönlü iletişimin çoğu, sinyal moleküllerinin ve sitokinlerin artan salgılanmasından kaynaklanır. Reaktif mikroglia ve astrositler, hücreler arasında sinyal veren ve sinir sistemi ortamındaki değişikliklere tepkileri koordine eden bir dizi sitokin ve kemokin salgılar. Bu pleiotropik proteinler, hücre sinyalizasyonunda yer alır ve makrofajlar ve mikroglia, astrositler, B lenfositleri, T lenfositleri ve mast hücreleri dâhil olmak üzere bir dizi bağışıklık hücresi tarafından salınır. Böylece, beyindeki değişiklikleri takiben CNS ve periferik immün sistemdeki inflamatuvar yanıtı yönlendirirler. IL-1, IL-2, IL-6, Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ve İnterferon gama (IFN- $\gamma$ ) dâhil olmak üzere bunlardan birçoğunun, reaktif astrogliosis (Astrogliaz; aynı zamanda astrositoz veya reaktif astrogliaz olarak adlandırılır. Merkezi sinir sistemi travması, enfeksiyon, iskemi, felç, otoimmün tepkiler veya nörodejeneratif hastalıklardan dolayı yakındaki nöronların tahrip olması nedeniyle astrosit sayısında anormal bir artıştır ) neden olduğu bulunmuştur [162]. Masi ve arkadaşları tarafından ASD'de sitokin sapmaları üzerine yapılan sistemik bir gözden geçirme ve meta analiz araştırmasında otizmde artmış inflamatuvar durum ve değişmiş sitokin profili gösterilmiştir. Toplam örneklem büyüklüğü 743 ASD'li ve 592 sağlıklı kontrolü içeren 17 araştırma analize dahil edilmiştir. On dokuz sitokin değerlendirilmiştir. İnterlökin (IL)-1beta ( $P<0.001$ ), IL-6 ( $P=0.03$ ), IL-8 ( $P=0.04$ ), interferon-gama ( $P=0.02$ ), eotaksin ( $P=0.01$ ) ve MCP 1 ( $P<0.05$ ) konsantrasyonları, ASD'li katılımcılar ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında anlamlı olarak ASD grubunda yüksek bulunmuştur [194].

Bağışıklık sistemi, çeşitli hücre ve proteinlerin karşılıklı etkileşimi ve ortak çalışması ile vücudu mikroplara karşı koruyan; yara iyileşmesini, rejenerasyonu ve doku homeostazını destekleyen kusursuz bir savunma sistemidir. Bu işlevler, zaman ve mekâna özgü bir tarzda haberci ve efektör moleküllerin üretimi yoluyla lökositler tarafından yönetilir. Sitokinler, hedef hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını otokrin veya parakrin mekanizmalarla

düzenlemek için lökositler tarafından üretilen tartışmasız en önemli haberci moleküllere aittir. Sitokinler, bağışıklık sistemindeki en önemli efektör ve haberci moleküller arasındadır. Enfeksiyon ve iltihaplanma sırasında bağışıklık tepkilerine derinden katılırlar, alerji, otoimmünite ve kanser gibi hastalıklara karşı koruma sağlar veya bunlara katkıda bulunurlar. Bu nedenle sitokin yollarını manipüle etmek, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için en etkili stratejilerden biridir [205]. Sitokinler, özellikle proinflatuar olanlar, davranışların düzenlenmesinde de bir dizi rol oynar [195].

Jyonouchi ve arkadaşları tarafından Amerika Minnesota Üniversitesi Pediatri departmanında yürütülen bir araştırmaya 71 otizmlı çocuk dâhil edilmiş ve Otizm spektrum bozukluğu ve gelişimsel gerileme olan çocuklarda doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık tepkileri ile ilişkili proinflatuar ve düzenleyici sitokin üretimi incelenmiştir. Araştırmaya 23 normal gelişim gösteren kardeş ve 17 kişiden oluşan bir kontrol grubu dâhil edilmiştir. ASD grubundan alınan periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC'lerin), kontrollere kıyasla doğuştan gelen bağışıklık ile ilişkili aşırı proinflatuar ve düzenleyici sitokinler ürettiğini gözlemlemişlerdir. ASD grubunun kontrollere kıyasla TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 yı daha yüksek seviyelerde ürettiği belirlenmiştir [206]. Pecorelli ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen 'Rett ve otistik hastalarda sitokin profili ve periferik kan mononükleer hücre morfolojisi' adlı çalışmada 10 Rett, 12 otizm, 8 kontrol denekten alınan serumda 27 sitokin ve kemokinlik bir panel değerlendirilmiştir. IL 1Beta, IL 8, IL 13, IL 15 Rett ve ASD grubunda yüksek bulunmuştur. Otizmde düzensiz sitokin kemokin profili tanımlanmıştır [207].

Araştırmamızda otizm grubu ile kontrol grubu TNF Alfa bakımından karşılaştırıldığında TNF Alfa seviyesi KOKG grubunda (M= 925,65(884,15-998,05)) KSKG grubuna göre (M=923,50 (883,02-979,97)) bir miktar daha yüksektir fakat bu farklılık anlamlı değildir p=0,926.

Çalışmamızda IL 1 Beta (KOKG-KSKG p=0,491) bakımından otizm ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek denekleri ele aldığımızda kontrole (M=530,83 pg/ml (514,25-549,69)) kıyasla otizm grubunda (M= 557,12 pg/ml (515,97-613,71))IL 1Beta seviyesinde artış görülmektedir fakat p değeri anlamlı değildir. KOTASG ve KSKG grupları birbiri ile kıyaslandığında IL 1 Beta seviyesi anlamlı farklı bulunmuştur p=0,010 (p<0,05).



Oscos ve arkadaşları tarafından kemirgenlerde gerçekleştirilen bir araştırmanın sonuçlarına göre prefrontal korteks, IL-6 aracılı trans-sinyallemenin önemli bir potansiyel hedefi olarak gösterilmektedir ve Vagal sinir stimülasyonu, kemirgen prefrontal korteksinde lipopolisakarit kaynaklı akut stresin neden olduğu interlökin 6'ya bağlı sinaptik hipereksitabilitiyi bloke eder. Araştırma IL-6 dolayımı bir trans-sinyallemenin önemli potansiyel bir hedef olduğunu ve epilepsi, şizofreni, psikoz, anksiyete bozuklukları, otizm spektrum bozuklukları da dâhil olmak üzere nöropsikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde potansiyel yeni bir yol olduğunu önermektedir [204].

IL 6 proinflamatuvar bir sitokindir ve yükselmiş IL-6 seviyeleri otizmlili bireylerin karakteristiğidir [194, 208-210].

Araştırmamızda IL 6 (pg/ml) seviyesi otizm grubunda (KOKG M= 454,94 (438,08-478,46)) kontrole (KSKG M= 447,84 (435,42-457,60)) kıyasla bir miktar daha yüksektir fakat bu farklılık anlamlı değildir  $p= 0,423$ . Araştırmamızda IL 6 seviyesi bakımından üç grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir  $p=0,613$ .

IL-10 ailesi sitokinleri, aşırı inflamatuvar yanıtların kısıtlanması, doğuştan gelen bağışıklığın regülasyonu ve doku onarım mekanizmalarının desteklenmesi yoluyla enfeksiyon ve inflamasyon sırasında doku homeostazını sürdürmek için temel işlevleri yerine getirir. IL-10 ailesi sitokinleri, işlevlerine göre kabaca üç alt gruba ayrılabilir. İlk grup sadece, hem doğal hem de adaptif bağışıklık tepkilerini hedefleyen, aşırı ve kontrolsüz inflamatuvar efektör tepkilerinin neden olduğu doku hasarını azaltmak için, özellikle enfeksiyon ve iltihabın çözülme aşamasında ve bağırsak mikroplarına karşı homeostazı sürdürmek için bağışıklık bastırıcı işlevler uygulayan IL-10'u içerir. İkinci grup, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 ve IL-26 dâhil olmak üzere IL-20 alt ailesi sitokinlerini içerir. Bu sitokinler, hücre dışı hücrel patojenlerin istilasını kontrol eden doğuştan gelen konak savunma mekanizmalarını indüklemek için öncelikle doku epitel hücreleri ve stroma hücreleri üzerinde hareket eder. Ek olarak, çeşitli doku ve organların çoğalmasını, yeniden şekillenmesini ve onarımını teşvik ederek bariyer bütünlüğünü ve doku homeostazını korumak için geniş bir rol oynarlar. Son olarak, IL-28A, IL-28B ve IL-29 dâhil olmak üzere IL-28 sitokin alt ailesi, yaygın olarak tip III IFN'ler olarak sınıflandırılır ve sırasıyla IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 ve IFN- $\lambda$ 1 olarak adlandırılır. Tip I IFN ailesi sitokinleri ile büyük ölçüde örtüşen biyoloji ve aşağı akış sinyal yollarını paylaşırlar, ancak tercihen doku epitel hücrelerini hedeflerler. IL-10 ailesi sitokinleri, çok

yönlü işlevlere sahip güçlü bağışıklık aracılarıdır. Keşfedilmelerinden bu yana, bu sitokinleri otoimmünite ve kanserler de dâhil olmak üzere birçok hastalık için terapötik stratejiler olarak modüle etmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Bununla birlikte, bugüne kadar IL-10 ailesi, klinikte onaylanmış bir ilaca sahip olmayan sitokin ailelerinden biri olmaya devam etmektedir. Klinik çevirideki zorlukların birçok nedeni olabilir. Karmaşık, hatta ters yöndeki biyolojik etkiler, zorluklara katkıda bulunur. Örneğin, IL-10 hem immünosupresif hem de uyarıcı etkilere sahiptir, IL-22, bağırsakta doku onarımını teşvik ederken, cilt iltihabı sırasında akantoza neden olur [205]. İnterlökin-22 (IL-22), T-yardımcı (Th)-17 hücreleri,  $\gamma\delta$  T hücreleri, NKT hücreleri ve yeni tanımlanan doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) tarafından üretilen, yakın zamanda tanımlanmış bir IL-10 ailesi sitokindir [211].

Moaz ve arkadaşları tarafından 44 ASD, 45 kontrol ile gerçekleştirilen araştırmada, ASD'li çocuklarda Th17/Treg hücre dengesizliği ve bunlarla ilgili sitokinler (IL-17, IL-10 ve TGF- $\beta$ ) üzerine gerçekleştirilen araştırmada azalan IL 10 seviyeleri otizm ile ilişkilendirilmiştir. Dolaşımdaki Th17 ve Treg hücre yüzdelerini belirlemek için flowcytometry, sitokin ekspresyonu için RT-PCR ve ELISA kullanılmıştır, Treg hücreleri lenfositlerin bağışıklık sistemini baskılayıcı elemanlarıdır, T yardımcı hücresi 17 ( Th 17 ), interlökin 17 (IL-17) üretimi ile tanımlanan pro-enflamatuar yardımcı T hücrelerinin bir alt kümesidir araştırma otizmde bu hücrelerdeki dengesizliğe vurgu yapmıştır [212]. Bizim araştırmamızda da IL 10 seviyesi kronik sağlıklı gruba kıyasla kronik otizm grubunda bir miktar daha düşüktür fakat bu farklılık anlamlı düzeyde değildir  $p=0,696$ . Araştırmamızda üç grup birbiri ile kıyaslandığında IL 10 seviyesi anlamlı bulunmuştur ve post hoc analizler ile bu farklılığa KOTASG ve KOKG gruplarının neden olduğu saptanmıştır  $p=0,014$  ( $p<0,05$ ).

Enflamatuar refleks olarak adlandırılan vagus siniri aracılı bir fizyolojik mekanizma, proinflamatuar sitokinlerin ve enflamasyonun seviyelerini düzenler. Enflamatuar refleks vagusun dorsal motor çekirdeği olan beyin sapı çekirdeğinde başlar. Vagus siniri boyunca uzanan nöronlar splenik sinirle etkileşime girer. Splenik sinir, dalak parankiminde norepinefrin salgılar, bu da kolin asetiltransferaz enzimini eksprese eden bir T-hücresi alt kümesinden asetilkolin (ACh) salınmasını tetikler. ACh daha sonra makrofajlarda eksprese edilen  $\alpha 7$  nikotinik ACh reseptörleri ( $\alpha 7nAChR$ ) aracılığıyla etki ederek TNF ve diğer proinflamatuar sitokinlerin üretimini ve salımını baskılar. VNS'nin inflamasyon ve hastalık patogenezinde önemli bir moleküler aracı olan TNF'nin serum seviyeleri üzerindeki belirgin etkisi bu mekanizma ile açıklanabilir. TNF dâhil olmak üzere sitokinler, pro- veya anti-

inflatuar etkilere aracılık edebilen bağımsız ve sinerjistik etkilere sahip, inflamatuvar yanıt için çok önemli olan büyük bir sinyal molekülleri grubudur. Pro- ve anti-inflatuar sitokinlerin dengesi esastır: belirli durumlarda denge, iltihaplanma ve hücre ölümüne aracılık eden kronik bir proinflatuar ortama doğru kayar. [203]. Borovikova ve arkadaşları tarafından yürütülen araştırmada Sıçanlarda in vivo olarak periferik vagus sinirinin doğrudan elektriklerle uyarılmasının, karaciğerde TNF sentezini inhibe ederek, serum TNF miktarlarını zayıflattığı gösterilmiştir (7 kontrol, 7 vagotomi) [202].

Araştırmamızda dişi ve erkek denekler arasında serum TNF-alfa seviyesi bakımından anlamlı farklılık bulunmuştur  $p=0,012$  ( $p<0,05$ ). Fakat KOTASG M=893,70 (844,75-952,25), KOKG M=925,65 (884,15-998,05) ve KSKG M= 923,50 (883,02-979,97) olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında TNF Alfa seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Stimulasyon grubu ile otizm grubu göz önüne alındığında araştırmamızda TNF Alfa seviyesinin hem dişi hem erkek deneklerde stimulasyon grubunda azaldığı gözlenmektedir ancak bu azalma anlamlı miktarda değildir.

İnflamasomlar, aktivitesi proinflatuar sitokinlerin üretimi ile sonuçlanan inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde yer alan multimerik proteinlerdir [213]. İnflamasomlar, doğuştan gelen bağışıklık savunmalarını devreye sokmak için interlökin-1 $\beta$  gibi proinflatuar sitokinlerin olgunlaşmasını tetikleyen hücresel enfeksiyon veya stres üzerine aktive olan moleküler yapılardır. NLR ailesi, yaygın olarak C-terminal lösin bakımından zengin tekrarlar (LRR'ler) ve N-terminal kaspaz (CARD) veya pirin (PYD) ile çevrili merkezi bir nükleotid bağlama ve oligomerizasyon (NACHT) alanının varlığı ile karakterize edilir. Tüm NLR ailesi üyeleri için ortak tek alan olan NACHT alanı, ATP'ye bağlı oligomerizasyon yoluyla sinyal kompleksinin aktivasyonunu sağlar. NLR ailesi NACHT alanlarının filogenetik analizi, NLR ailesi içinde 3 farklı alt aile ortaya koymaktadır; NOD, IPAF, NLRP. İnflamasomlar, kendi kendini oligomerize eden iskele proteinleri tarafından birleştirilir. Bir dizi NLR ailesi üyesinin in vitro olarak inflamatuvar aktivite sergilediği rapor edilmiştir; bununla birlikte, az sayıda NLR ailesi üyesinin in vivo olarak net fizyolojik işlevleri vardır. NLRP3, tüm patojenlerin yanı sıra bir dizi yapısal olarak çeşitli PAMP'lere, DAMP'lere ve çevresel tahriş edicilere maruz kaldığında aktive olur [214]. NLRP3 enflamazomu sitozolik bir reseptör proteinidir, enflamatuvar uyaranlarla aktivasyonun ardından birincil olarak immün ve enflamatuvar hücrelerde bulunur ve immün sistem hücrelerine ulaşan tehlike sinyallerini tanıyarak IL-1 $\beta$  ile IL-18 aracılı inflamatuvar

yanıtların başlamasında görev alır [215]. NLRP1, NLRP3 ve NLRP4 içeren bir pirin alanına (NLRP) sahip bir NLR dâhil olmak üzere birçok prototipik NLR'nin aktivasyonu, farklı proinflatuar sitokinlerin (IL-1 $\beta$  ve IL-18) olgunlaşması ve salınmasıyla sonuçlanır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak, NLRP enflamasyonu, konağın zararlı tehditlere karşı savunmasını düzenler. Aktivasyonu, mikrogial aracılı nöroinflamasyon ve kısmi nöronal dejenerasyonla ilişkilendirilir [216]. Maternal NLRP3 antagonist tedavisinin, yavrularda otizm benzeri fenotipe karşı koyduğu yönünde araştırmalar mevcuttur. Szabo ve arkadaşları tarafından maternal immün aktivasyon (MIA) otizm modeli ile C57BL/6 farelerde gerçekleştirilen araştırmada; hamilelik sırasında NLRP3 antagonisti (engelleyci) MCC950 ve nötralize edici bir IL-1 $\beta$  antikoru ile anne tedavisi, yavru farelerde otistik özelliklerin gelişimini önlemiştir [208]. Zhao ve arkadaşları tarafından hamile sıçanlara intraperitoneal VPA enjeksiyonu ile gerçekleştirilen araştırmada ST36 akupunktur otistik sıçanların TXNIP ekspresyonunu azaltmış NLRP3 enflamasyonun aktivasyonunu inhibe etmiş ve prefrontal korteks ile ilgili davranış bozukluğunu hafifletmiştir. Bu araştırma da davranış deneyleri olarak; hot plate, open field, morris water maze, 3 chamber test kullanılmıştır [217]. Tang ve arkadaşları tarafından sıçanlar üzerinde vagal sinir stimülasyonu ile gerçekleştirilen bir erken travmatik beyin hasarı araştırmasında VNS'nin NLRP3 enflamasyonunun aktivasyonunu önemli ölçüde bastırdığı belirlenmiştir (araştırma n=30 olmak üzere üç grup olarak gerçekleştirilmiştir). Ayrıca VNS'nin doku hasarını, nörolojik kusurları, serebral ödemi önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir [218]. Saresella ve ark. tarafından yapılan bir insan çalışmasında 25 ASD, 23 sağlıklı kardeş, 30 kontrole ait enflamasomların aktivitesi, enflamasyonlardan türetilen proinflatuar sitokinler interlökin (IL)-1 $\beta$  ve IL-18'in konsantrasyonu ve GI hasarının serum parametreleri değerlendirilmiştir. ASD'de artmış inflamatuvar ve NLRP3 aktivasyonları gözlemlenmiştir [213].

Araştırmamızda KOTASG, KOKG ve KSKG olmak üzere 3 grup birbiri ile kıyaslandığında NLRP 3 seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. ( $p<0,05$ ). Daha sonra yapılan post-hoc analizde asıl farklılığa neden olan grupların KOTASG – KSKG ve KOKG- KSKG arasında olduğu saptanmıştır  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ). Araştırmamızda sağlıklı kontrollere kıyasla otizm grubunda NLRP 3 seviyeleri (ng/ml) hem dişi hem erkek deneklerde artmıştır ve anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

Günümüzde inflamasyonun hem gelişmekte olan hem de yetişkin beyninde merkezi sinir sistemi (CNS) hasarına önemli bir katkı sağladığı giderek daha fazla kabul edilmiştir. Enflamatuar mediatörler, gelişim sırasında beyni etkiler, çeşitli araştırmalarda ASD erken yaşam dönemindeki iltihap ile ilişkilendirilmiştir. Sitokinler, konakçı immün yanıtını koordine eder ve ayrıca CNS dahil olmak üzere immün ve immün olmayan kaynaklı hücreler arasındaki normal sinyalleşmeye aracılık eder. Gelişmekte olan CNS içindeki hücreler, otokrin ve parakrin sinyalleme için sitokinler kullanır ve sitokinlerin birçoğu aynı zamanda bağışıklık modülatörleri olarak da hizmet ettiğinden, normal sitokin aracılı gelişimsel süreçler, sitokin dengesizlikleri tarafından bozulmaya karşı hassastır [219]. Proinflamatuvar sitokinler inflamasyonu tetiklerken antiinflamatuvar sitokinler inflamasyonu inhibe etmede görevlidirler ve aralarında bir denge söz konusudur. Çalışmamızda çeşitli parametreler arasında anlamlı korelasyon gözlenmiştir.

İnterlökin-22 (IL-22), T-yardımcı (Th)-17 hücreleri,  $\gamma\delta$  T hücreleri, NKT hücreleri ve yeni tanımlanan doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) tarafından üretilen, yakın zamanda tanımlanmış bir IL-10 ailesi sitokindir [211]. Çalışmamızda IL 10 ve IL 22 arasında pozitif güçlü bir korelasyon  $p=0,00$  ( $p<0,05$ ) gözlenmiştir. Plazma IL 10 seviyesinin TNF Alfa ve IL 6 düzeyleri ile korelasyon gösterdiğini tesbit eden araştırmalar mevcuttur [220]. Çalışmamızda IL 10, TNF Alfa ile pozitif(orta) korele, IL 6 ile pozitif (güçlü) korele bulunmuştur. IL-10 ailesi sitokinleri, çok yönlü işlevlere sahip güçlü immün araçlardır. IL 10 antiinflamatuvar bir sitokindir ama hem baskılayıcı hem uyarıcı etkilere sahiptir [205].

NLRP1, NLRP3 ve NLRP4 dâhil olmak üzere birçok prototipik NLR'nin aktivasyonu, farklı proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 $\beta$  ve IL-18) olgunlaşması ve salınmasıyla sonuçlanır [216]. Araştırmamızda IL 1Beta ile NLRP 3 arasında bir korelasyon ilişkisi gözlenmemiştir.

Gelecekteki çalışmalar, bir dizi duyuşal, motor, rehabilite edici tedavilerle eşleştirilmiş hem invaziv hem de invaziv olmayan VNS'yi değerlendirmelidir. Ayrıca otizmde terapötik bir yaklaşım olarak sitokin modülasyonuna yönelik ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Annede çeşitli sebeplerle ortaya çıkan inflamasyonun yavruda otizme sebep olabileceği göz önüne alındığında bu inflamasyonu önlemeye yönelik yeni araştırmalar büyük öneme sahiptir. Otizmde immün anormallikler kırk yılı aşkın bir süre önce tanımlanmış olmasına rağmen hala bu mekanizmalar net olarak açıklanamamıştır bu nedenle ASD'de immün disfonksiyon çalışmaları gereklidir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Otizm yaygın gelişimsel bozukluklar arasında yer alan son derece heterojen bir nörogelişimsel bozukluktur ve prevalansı son yıllarda dramatik şekilde artmıştır, veriler dünya genelinde yaygınlıktaki yükselişi doğrulamaktadır. Otizmin Dünya çapında nüfus da yaygınlığı yaklaşık % 1'dir ve altında yatan sebepler henüz net olarak aydınlatılamamıştır, otizmlili bireylerdeki yüksek değişkenlikler nedeniyle, birçok uzman, her biri biraz farklı bir etiyolojiye sahip, birçok farklı otizm teorisini varsaymaktadır. Otizmin altında yatan sebepler hala belirsiz olmasına rağmen, en çok kabul gören nedensellik hipotezi birden çok faktörün karşılıklı etkileşimler ile otizme yol açtığı yönündedir. Bunların nörotransmitter dengesizliğine, işlevsiz nöronal yollara, anormal sinaptogeneze ve nöronal bağlantıya yol açtığı düşünülmektedir. Otizm etiyolojisinde inflamasyon önemli bir yere sahiptir. Hem akut hem de sistemik kronik inflamasyon tarafından tetiklenen maternal immün aktivasyonun, nörogelişimsel bozuklukların patogeneğinde yer alan mekanizmalardan biri olduğu öngörülmektedir.

Otizmin belirtilerinin pozitif yönde azalmasına neden olan girişimsel çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri “vagal stimülasyon”dur. Merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sistemi çeşitli şekillerde birbirine bağlıdır. Hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklığın kollarının otizmin patofizyolojisine dâhil olduğu varsayılmaktadır. Yardımcı T hücreleri, sitokinler üreterek doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin işlevini düzenler. Psikonöroimmünolojik disiplin göz önüne alındığında, sitokinler nörotrofik etkileri yoluyla nöronların fonksiyonel bütünlüğü için gerekli desteği sağlar. Bununla birlikte, aşırı üretimleri, nöroanatomik yapılarda ve nöronal plastisitede bozulmalara neden olan immüno-sitotoksisteye yol açar. Pro-inflamatuar sitokinlerin ve özellikle tümör nekroz faktörün otistik deneklerin serumunda arttığı gözlenen çalışmalar bulunmaktadır. Otizmlili çocukların daha yüksek konsantrasyonda IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 ve IL-13 seviyelerine sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ve interlökinlerin tanıda potansiyel biyobelirteç olabileceği yönünde görüşler söz konusudur.

Araştırmamız otizmde hayvan modellerini, inflamasyonu, vagus sinirinin önemini, tNVS'yi daha iyi anlayabilmek ve bu alandaki bilgileri daha ileriye taşıyabilmek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda otizm modeli, C57BL/6 gebe farelere embriyonik dönemde VPA uygulayarak tarafımızca gerçekleştirilmiştir. OFT, EPM, MCT, TCT olmak

üzere 4 farklı davranış deneyi ile de hayvanların davranış deneyleri sağlanmıştır. Çalışmamız için 3 grup oluşturulmuştur; Kronik Otistik Transcutanöz Auricular Stimülasyon Grubu (KOTASG), Kronik Otistik Kontrol Grubu (KOKG), Kronik Sağlıklı Kontrol Grubu (KSKG). Her grup 8 dişi 8 erkek fare olmak üzere 16 fareden oluşturulmuştur (N=48). KOTASG grubumuza genel anestezi altında transaurikular vagus sinir stimülasyonu uygulanmıştır. Üç grubun da kan ve beyin dokuları kullanılarak, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler ELİSA yöntemi ile incelenmiştir. Kanlarda IL 1 Beta, IL 6, IL 10, IL 22, TNF-alfa ve beyin dokularında NLRP 3 düzeylerine bakılmıştır. TNF-alfa parametresini tüm denekleri cinsiyete göre kıyasladığımızda dişiler ve erkekler arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). KOTASG grubunda IL 22 parametresi dişi ve erkek denekler arasında anlamlı farklı bulunmuştur  $p=0,038$  ( $p<0,05$ ). IL10 ve IL 22 parametresi üç grup arasında anlamlı olarak farklı bulunmuş ( $p<0,05$ ) ve bu farklılığı KOTASG ve KOKG grubunun sağladığı belirlenmiştir. IL 1 Beta parametresi KOTASG ve KSKG grupları arasında kıyaslandığında anlamlı olarak farklı bulunmuştur  $p=0,010$  ( $p<0,05$ ). NLRP 3 parametresi üç grup birbiri ile kıyaslandığında anlamlı olarak farklı bulunmuş ( $p<0,05$ ) ve bu farklılığı KOTASG – KSKG ve KOKG- KSKG gruplarının sağladığı post-hoc analizler ile belirlenmiştir. Çalışmamız vagus sinir stimülasyonunun otizme etkileri ve otizm ve inflamasyon ilişkisi konusunda bilim dünyasına veri sağlamıştır, bu nedenle ileride bu alanda gerçekleştirilecek çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz. Araştırmamızda sadece 6 sitokin analiz edilebilmiştir. Buna rağmen otizm modelinde kan ve beyin dokularında çeşitli inflammatuar sitokin düzeyleri konusunda daha fazla kanıt olarak bilim dünyasına katkı sağlamıştır. Bulgularımız otizmdeki sitokin düzensizliklerine bir kanıt niteliğindedir, otizmde terapötik bir yaklaşım olarak sitokin modülasyonuna yönelik ileri araştırmalara ihtiyaç olduğuna dair fikir vermektedir.

Sonuç olarak farklı biyolojik yollardaki kusurlar bizi benzer bir sonuca; otizme götürebilmektedir. İnflamasyon otizmin hem etiolojisinde hem de potansiyel biyobelirteçlerinde önemli bir yere sahiptir. Vagus siniri onuncu ve en uzun kranial sinirimizdir, bu sinirin stimülasyonu ağrı ve epilepsi tedavisinde FDA onaylıdır. Epilepsi otizimli bireyler de de komorbid bir durum olarak sık gözlenmektedir. Vagus siniri beyin ve bağırsak arasındaki iletişimde önemli görevlere sahiptir ve bu sinirin stimülasyonu nörodejeneratif hastalıklar, nörogelişimsel hastalıklar, inflammatuar bağırsak hastalıkları gibi pek çok hastalıkta potansiyel bir terapötik hedef olarak görülmektedir. Otizmde potansiyel bir terapötik hedef olarak VNS araştırmaları giderek artmaktadır. Son yıllarda yapılan pek



çok araştırma ile otizmin etiyolojisi konusunda büyük yol katedilmiştir fakat bu veriler otizmin etiyopatogenezine bakış açımız için bize ışık tutsa da hala aydınlatılması gereken önemli noktalar vardır. İnsidansı hızla artan bu nörogelişimsel bozukluğu daha iyi anlamak, erken teşhisini sağlamak, biyobelirteç bulmak ve tedavi yöntemleri geliştirebilmek için yeni çalışmaların yapılması büyük önem taşımaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Sanchack, K. E. and Thomas, C. A.(2016). Autism Spectrum Disorder: Primary Care Principles. *American Family Physician*, 94 (12), 972-979.
2. Chiarotti, F. and Venerosi, A. (2020). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sciences*, 10 (5), 274.
3. Lai, M.C., Lombardo, M.V., and Cohen, S. B. (2014). Autism. *The Lancet*, 383 (9920), 896-910.
4. Folstein, S. and Rutter, M. (1997). Genetic influences and infantile autism. *Nature*, 265 (5596), 726-8.
5. Newschaffer, C.J., Croen, L.A., Daniels,J., Giarelli,E., Grether, J.K., Levy,S.E., Mandell, D. S., Miller, L. A., Martin, J. P., Reaven, J., Reynolds, A. M. (2007). The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual Reviews Public Health*, 28, 235-58.
6. Croonenberghs, J., Wauters, B., Devreese, K., Verkerk, R., Scharpe, S., Bosmans, E., Egyed, B., Deboutte,M. (2002). Increased serum albumin, gamma globulin, immunoglobulin IgG, and IgG2 and IgG4 in autism. *Psychological Medicine*, 32 (8), 1457-63.
7. Molloy, C.A., Morrow, A. L., Derr, J. M., Courtney, P. M., Altaye, M., Karp, M. W. (2006). Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *Journal of Neuroimmunology*, 172 (1-2), 198-205.
8. Zimmerman, A.W., Jyonouchi, H., Comi, A. M., Milstien, S., Varsou, A., Heyes, M. P. (2005) . Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatric Neurology*, 33 (3), 195-201.
9. Nelson, K.B., Grether, J. K., Croen, L. A., Dambrosia, J. M., Dickens, B. F., Jelliffe, L. L., Hansen, R. L., Phillips, T. M. (2001). Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Annals Neurology*, 49 (5), 597-606.
10. Donovan, A.P. and Basson, M. A.(2017). The neuroanatomy of autism - a developmental perspective. *Journal of Anatomy*, 230 (1), 4-15.
11. Kordulewska, N.K., Kostyra, E., Ogorek, K. P., Fiedorowicz, E., Jarmolowska, B. (2019., Serum cytokine levels in children with spectrum autism disorder: Differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Journal of Neuroimmunology*. 337, 577066.
12. Abdallah, M.W., Larsen, N., Mortensen, E. L., Atladottir, H., Pederson, B. N., Jorgensen, E. B. C., Grove, J., Hougaard, D. M. (2012). Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: an exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *Journal of Neuroimmunology*, 252 (1-2), 75-82.
13. Derakhshan, N. (2015). Vagal Nerve Stimulation for the Treatment of Autism. *Mental Illnes*, 7 (1), 5788.

14. Servadio, M., Vanderschuren, L. J. , and Trezza, V. (2015). Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? *Behavioural Pharmacology*, 26 (6), 522-40.
15. Halladay, A. K., Amaral, D., Aschner, M., Bolivar, V. J., Bowman, A., Bloom, E. D., Hyman, S. L., Keller, F., Lein, P., Pessah, I., Restifo, L., Threadgill, D. W. (2009). Animal models of autism spectrum disorders: information for neurotoxicologists. *Neurotoxicology*, 30 (5), 811-21.
16. Varghese, M., Keshav, N., Descombes, S. J., Warda, T., Wicinski, B., Dicktein, D. L., Nicolas, H. H., Rubies, S. D., Drapeau, E., Buxbaum, J. D., Hof, P. R. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathologica*, 134 (4), 537-566.
17. Dyken, P. and Krawiecki, N. (1983). Neurodegenerative diseases of infancy and childhood. *Annals of Neurology*, 13 (4), 351-64.
18. Dugger, B.N. and Dickson, D.W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (7), a028035.
19. Espay, A.J., Aybek, S., Carson, A., Edwards, M. J., Goldstein, L. H., Hallett, M., Lafaver, K., Lang, A. E., Nicholson, T., Nielsen, G., Reuber, M., Voon, V., Stone, J., Morgante, F. (2018). Current Concepts in Diagnosis and Treatment of Functional Neurological Disorders. *JAMA Neurology*, 75 (9), 1132-1141.
20. O'Neal, M.A. and Baslet, G. (2018). Treatment for Patients With a Functional Neurological Disorder (Conversion Disorder): An Integrated Approach. *The American Journal of Psychiatry*, 175 (4), 307-314.
21. McPartland, J. and Volkmar, F.R. (2012). Autism and related disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, 106, 407-18.
22. Kanner, L. (1946). Irrelevant and metaphorical language in early infantile autism. *The American Journal of Psychiatry*, 103 (2), 242-6.
23. Harris, J. (2018). Leo Kanner and autism: a 75-year perspective. *International Review of Psychiatry*, 30 (1), 3-17.
24. Hosseini, S.A. and Molla, M. (2021). *Asperger Syndrome*, in *StatPearls*. Treasure Island (FL), NBK557548.
25. Chaste, P. and Leboyer, M. (2012). Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14 (3), 281-92.
26. Marco, E. J., Hinkley, L. B. N., Hill, S. S., Nagarajan, S. S. (2011). Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatric Research*, 69 (5 Pt 2), 48R-54R.
27. Lindor, E., Sivaratnam, C., May, T., Stefanac, N., Howells, K., Rinehart, N. (2019). Problem Behavior in Autism Spectrum Disorder: Considering Core Symptom Severity and Accompanying Sleep Disturbance. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 487.

28. Hartley, S. L., Sikora, D. M., and McCoy, R. (2008). Prevalence and risk factors of maladaptive behaviour in young children with Autistic Disorder. *Journal of Intellectual Disability Research*, 52 (10), 819-29.
29. Solomon, M., Ozonoff, S., Carter, C., Caplan, R. (2008). Formal thought disorder and the autism spectrum: relationship with symptoms, executive control, and anxiety. *Journal of Autism Develoepmental Disords*, 38 (8), 1474-84.
30. Chandler, S., Howlin, P., Simonoff, E., O'Sullivan, T., Tseng, E., Kennedy, J., Charman, T., Baird, G. (2016). Emotional and behavioural problems in young children with autism spectrum disorder. *Developmental Medicine Child Neurology*, 58 (2), 202-8.
31. Summers, J., Shahrami, A., Cali, S., D2Mello, C., Kako, M., Reljin, A. P., Savage, M., Shaw, O., Lunskey, Y. (2017). Self-Injury in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability: Exploring the Role of Reactivity to Pain and Sensory Input. *Brain Sciences*, 7 (11), 140.
32. Mukherjee, S. B. (2017). Autism Spectrum Disorders - Diagnosis and Management. *Indian Journal Pediatrics*, 84 (4),307-314.
33. Pulikkan, J., Mazumder, A. and Grace, T. (2019). Role of the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorders. *Advances Experimental Medicine Biology*, 1118, 253-269.
34. Malow, B.A., McGrew, S. G., Harvey, M. Henderson, L. M., Stone, W. L. (2006) Impact of treating sleep apnea in a child with autism spectrum disorder. *Pediatric Neurology*, 34 (4), 325-8.
35. Canitano, R. (2007). Epilepsy in autism spectrum disorders. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 16 (1), 61-6.
36. Tuchman, R., Rapin, I. (2002) Epilepsy in autism. *The Lancet Neurology*, 1 (6), 352-8.
37. Accardo, J.A., Malow, B. A. (2015) Sleep, epilepsy, and autism. *Epilepsy Behavior*, 47, 202-6.
38. Vargason, T., Grivas, G., Hollowood-Jones, K. L., Hahn, J. (2020). Towards a Multivariate Biomarker-Based Diagnosis of Autism Spectrum Disorder: Review and Discussion of Recent Advancements. *Seminars in Pediatric Neurology*, 34, 00803.
39. Zwaigenbaum, L., Penner, M. (2018). Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. *BMJ*, 361, k1674.
40. Battle, D.E. (213). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). *Codas*, 25 (2), 191-2.
41. Kelly, J. R., Minuto, C., Cryan, J. F., Clarke, G., Dinan, T. G. (2017). Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers Neuroscience*, 11, 490.
42. Edmiston, E., Ashwood, P., Van de Water, J. (2017). Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 81 (5), 383-390.

43. Hazlett, H.C., Poe, M. D., Gerig, G., Styner, M., Chappel, C., Smith R. G., Vachet, C., Piven, J. (2011). Early brain overgrowth in autism associated with an increase in cortical surface area before age 2 years. *Archives of General Psychiatry*, 68 (5), 467-76.
44. Courchesne, E., Karns, C. M., Davis, H. R., Ziccardi, R., Carper, R. A., Tigue, Z. D., Chisum, H. J., Moses, P., Pierce, K., Lord, C., Lincoln, A. J., Pizzo, S., Schreibman, L., Haas, R. H., Akshoomoff, N. A., Courchesne, R. Y. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology*, 57 (2), 245-54.
45. Falougy, H.E., Filova, B., Ostatnikova, D., Bacova, Z., Bakos, J. (2019). Neuronal morphology alterations in autism and possible role of oxytocin. *Endocrine Regulations*, 53 (1), 46-54.
46. Emerson, R.W., Adams, C., Nishino, T., Hazlett, H. C., Woff, J. J., Zwaigenbaum, L., Constantino, J. N., Shen, M. D., Swanson, M. R., Elison, J. T., Kandala, S., Estes, A. M., Botteron, K. N., Collins, L., Danger, S. R., Evans, A. C., Gerig, G. (2017). Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. *Science Translational Medicine*, 9 (393).
47. Bhat, S., Acharya, U. R., Adeli, H. Bairy, G. M., Adeli A. (2014). Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. *Reviews Neuroscience*, 25 (6), 841-50.
48. Levy, S.E., Mandell, D. S., Schultz, R. T. (2009). *Autism. Lancet*, 374 (9701), 1627-38.
49. Styles, M., Alsharshani D., Samara M., Alsharshani M., Khattab, A., Qoronfleh, M. V., Al-Dewik, N. I. (2020). Risk factors, diagnosis, prognosis and treatment of autism. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 25 (9), 1682-1717.
50. Steinman, G. (2020). The putative etiology and prevention of autism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 173, 1-34.
51. Gevi, F., Zolla, L., Gabriele S., Persico, A. M. (2016). Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism. *Molecular Autism*, 7, 47.
52. Volkmar, F. R., Pauls, D. (2003). Autism. *Lancet*, 362 (9390), 1133-41.
53. Howsmon, D.P., Kruger, U., Melnyk, S., Hahn, J. (2017). Classification and adaptive behavior prediction of children with autism spectrum disorder based upon multivariate data analysis of markers of oxidative stress and DNA methylation. *PLoS Computational Biology*, 13 (3), e1005385.
54. Ratajczak, H.V. (2011). Theoretical aspects of autism: causes--a review. *Journal Immunotoxicology*, 8 (1), 68-79.
55. Mandy, W. Lai, M. (2016). Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 57 (3), 271-92.

56. Ali, A., Cui, X. Eyles, D. (2016). Developmental vitamin D deficiency and autism: Putative pathogenic mechanisms. *The Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175, 108-118.
57. DeVilbiss, E.A., Gardner, R. M., Newschaffer, C., Lee, B. K. (2015). Maternal folate status as a risk factor for autism spectrum disorders: a review of existing evidence. *The British Journal of Nutrition*, 114 (5), 663-72.
58. Bolte, S., Girdler, S., Marschik, P. B. (2018). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Science*, 76 (7), 1275-1297.
59. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *Lancet*, 392 (10146), 508-520.
60. Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. L., Hallmayer, J. F. (2017). Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics*, 18 (6), 362-376.
61. Lichtenstein, P., Carlström, E., Rastam, M., Gillberg, C., Anckarsater, H. (2010). The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *The American Journal of Psychiatry*, 167 (11), 1357-63.
62. Thapar, A., Rutter, M. (2021). Genetic Advances in Autism. *Journal of Autism Developmental Disorders*, 51 (12), 4321-4332.
63. Lintas, C., Persico, A. M. (2009). Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *Journal of Medical Genetics*, 46 (1), 1-8.
64. Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., Ergaz, Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive Toxicology*, 56, 155-69.
65. Dean, D.C., Freeman, A., Lainhart, J. (2020). The development of the social brain in baby siblings of children with autism. *Current Opinion in Psychiatry*, 33 (2), 110-116.
66. Trerotola, M., Relli, V., Simeone, P., Alberti, S. (2015). Epigenetic inheritance and the missing heritability. *Human Genomics*, 9, 17.
67. Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Briem, E., Fallin, M. D., Kaufmann, W. E., Feinberg, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Molecular Psychiatry*, 19 (8), 862-71.
68. Gyawali, S., Patra, B. N. (2019). Autism spectrum disorder: Trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 73 (8), 466-475.
69. Sun, W., Poschmann, J., Rosario, R. C. D., Parikshak, N. N., Hajan, H. S., Kumar, V., Ramasamy, R., Belgard, T. G., Elangovan, B., Wong, C. C. Y., Mill, J., Geschwind, D. H., Prabhakar, S. (2016). Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell*, 167 (5), 1385-1397.

70. Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38, 81-102.
71. Robertson, C. E., Baron-Cohen, S. (2017). Sensory perception in autism. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18 (11), 671-684.
72. Satterstrom, F.K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., Rubeis, S. D., An J., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Roeder, K., Buxbaum, J. D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180 (3), 568-584 e23.
73. Minshew, N. J., Williams, D. L. (2007). The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Archives of Neurology*, 64 (7), 945-50.
74. Gross, C. (2017). Defective phosphoinositide metabolism in autism. *Journal of Neuroscience Research*, 95 (5), 1161-1173.
75. Rodriguez-Escudero, I., Oliver, M. D., Andrés-Pons, A., Molina, M., Cid, V. J., Pulido, R. (2011). A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Human Molecular Genetics*, 20 (21), 4132-42.
76. Chen, J., Alberts, I., Li, X. (2014). Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 35, 35-41.
77. Gevezova, M., Sarafian, V., Anderson, G., Maes, M. (2020). Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 19 (5), 320-333.
78. Rossignol, D. A., Frye, R. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 17 (3), 290-314.
79. Contu, L., Hawkes, C. A. (2017). A Review of the Impact of Maternal Obesity on the Cognitive Function and Mental Health of the Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (5).
80. Rivera, H. M., Christiansen, K. J., Sullivan, E. L. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 194.
81. Raio, L., Bolla, D., Baumann M. (2015). Hypertension in pregnancy. *Current Opinion in Cardiology*, 30 (4), 411-5.
82. Smith, S. E., Garbett, J., Mirnics, K., Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, 27 (40), 10695-702.



83. Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., Nielsen, T. C., Mohammad, S. S., Hofer, M. J., Gold, W., Brilot, F., Lain, S. J., Nassar, N., Dale, R. C. (2021). Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: a systematic review. *Translational Psychiatry*, 11 (1), 71.
84. Estes, M. L., McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353 (6301), 772-7.
85. Sandin, S., Schendel, D., Magnusson, P., Hultman, C., Suren, P., Susser, E., Gronborg, T., Gissler, M., Gunnes, N., Gross, R., Henning, M., Bresnahan, M., Sourander, A., Hornig, M. (2016). Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Molecular Psychiatry*, 21 (5), 693-700.
86. Dalton, P., Deacon, R., Blamire, A., Pike, M., McKinlay, L., Stein, J., Styles, P., Vincent, A. (2003). Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. *Annals of Neurology*, 53 (4), 533-7.
87. Christensen, J., Gronborg, T. K., Sorensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309 (16), 1696-703.
88. Veiby, G., Daltveit, A. K., Scholber, S., Volset, S. E., Engelsen, B. A., Gilhus, N. E. (2013). Exposure to antiepileptic drugs in utero and child development: a prospective population-based study. *Epilepsia*, 54 (8), 1462-72.
89. Meador, K.J., (2008). Effects of in utero antiepileptic drug exposure. *Epilepsy Currents*, 8 (6), 143-7.
90. Jentink, J., Loane, M. A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J. K. (2010). Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *The New England Journal of Medicine*, 362 (23), 2185-93.
91. Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116-40.
92. Schiavi, S., Lezzi, D., Manduca, A., Leone, S., Melancia, F., Carbone, C., Petrella, M., Mannaioni, G., Masi, A., Trezza, V. (2019). Reward-Related Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 479.
93. Lazaro, M. T, Golshani, P. (2015). The utility of rodent models of autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurology*, 28 (2), 103-9.
94. Schwartz, J. J., Koenig, C. M., Berman, R. F. (2013). Using mouse models of autism spectrum disorders to study the neurotoxicology of gene-environment interactions. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 17-35.
95. Liu, C. X., Li, C. Y., Wang, Y., Lin, J., Jiang, Y. H., Li, Q., Xu, X. (2018). CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors. *Molecular Autism*, 9, 23.

96. Newell, C., Bomhof, M. R., Reimer, R. A., Hittel, D. S., Rho, J. M., Shearer, J. (2016). Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 7 (1), 37.
97. Meyza, K. Z., Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76 (Pt A), 99-110.
98. Costa, A. A., Morato, S., Roque, A. C., Tinos, R. (2014). A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. *Journal Neuroscience Methods*, 236, 44-50.
99. Kenny, B. J., Bordoni, B., (2021). Neuroanatomy, Cranial Nerve 10 (Vagus Nerve), in *StatPearls. Treasure Island (FL)*.
100. Berthoud, H. R., Neuhuber, W. L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience*, 85 (1-3), 1-17.
101. Sonne, J., Lopez-Ojeda, W. (2021). Neuroanatomy, Cranial Nerve, in *StatPearls. Treasure Island (FL)*.
102. Baker, E., Lui, F. (2021). Neuroanatomy, Vagal Nerve Nuclei, in *StatPearls. Treasure Island (FL)*.
103. Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G., Hasler, G. (2018). Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 44.
104. Pavlov, V. A., Tracey, K. J. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 8 (12), 743-54.
105. Andersson, U., Tracey, K. J. (2012). Reflex principles of immunological homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 30, 313-35.
106. Orosz, I., McCormick, D., Zamponi, N., Varadkar, S., Feucht, M., Parain, D., Griens, R., Vallee, L., Boon, P., Rittey, C., Jayewadene, A. K., Bunker, M., Arzimanoglou, A., Lagae, L. (2014). Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy: a European long-term study up to 24 months in 347 children. *Epilepsia*, 55 (10), 1576-84.
107. Engineer, C. T., Hays, S. A., Kilgard, M. P. (2017). Vagus nerve stimulation as a potential adjuvant to behavioral therapy for autism and other neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 9, 20.
108. Hull, M. M., Madhavan, D., Zaroff, C. M. (2015). Autistic spectrum disorder, epilepsy, and vagus nerve stimulation. *Child's Nervous System*, 31 (8), 1377-85.
109. Holdsworth, S. R., Gan, P. Y. (2015). Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clinical Journal of the American Society Nephrology*, 10 (12), 2243-54.
110. Carpenter, S., Fitzgerald, K. A. (2018). Cytokines and Long Noncoding RNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10 (6).

111. Xu, N., Li, X., Zhong, Y. (2015). Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators of Inflammation*, 2015, 531518.
112. Metz, C. N., Pavlov, V. A. (2018). Vagus nerve cholinergic circuitry to the liver and the gastrointestinal tract in the neuroimmune communicatome. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 315 (5), G651-G658.
113. Uddin, L. Q., Dajani, D. R., Voorhies, W., Besnarz, H., Kana, R. K. (2017). Progress and roadblocks in the search for brain-based biomarkers of autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Translational Psychiatry*, 7 (8), e1218.
114. Strimbu, K., Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinions in HIV and AIDS*, 5 (6), 463-6.
115. Yerys, B. E., Pennington, B. F. (2011). How do we establish a biological marker for a behaviorally defined disorder? Autism as a test case. *Autism Research*, 4 (4), 239-41.
116. Shen, M. D., Nordahl, C. W., Young, G. S., Gorges, S. L., Lee, A., Liston, S. E., Harrington, K. R., Ozonoff, S., Amaral, D. G. (2013). Early brain enlargement and elevated extra-axial fluid in infants who develop autism spectrum disorder. *Brain*, 136 (Pt 9), 2825-35.
117. Shen, M. D., Kim, S. H., McKinsrty, R. C., Gu, H., Hazlett, H. C., Nordahl, C. W., Emerson, R. W., Shaw, D., Elison, J. T., Swanson, M. R., Fonov, V. S., Gerig, G., Pruett, J., Fonov, V., Piven, J., Styner, M., Das, S., Gerig, G. (2017). Increased Extra-axial Cerebrospinal Fluid in High-Risk Infants Who Later Develop Autism. *Biological Psychiatry*, 82 (3), 186-193.
118. Carbone, E., Manduca, A., Cacchione, C., Vicari, S., Trezza, V. (2021). Healing autism spectrum disorder with cannabinoids: a neuroinflammatory story. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 121, 128-143.
119. Ristori, M. V., Mortera, S. L., Marzano, V., Guerrero, S., Vernocchi, P., Lanaro, G., Gardini, S., Torre, G., Valeri, G., Vicari, S., Gasbarrini, A., Putignani, L. (2020). Proteomics and Metabolomics Approaches towards a Functional Insight onto AUTISM Spectrum Disorders: Phenotype Stratification and Biomarker Discovery. *International Journal Of Moleculr Sciences*, 21 (17).
120. Hewitson, L., Mathews, J. A., Devlin, M., Schutte, C., Lee, J., German, D. C. (2021). Blood biomarker discovery for autism spectrum disorder: A proteomic analysis. *PLoS One*, 16 (2), e0246581.
121. Frye, R. E., Vassall, S., Kaur, G., Lewis, C., Karim, M., Rossignol, D. (2019). Emerging biomarkers in autism spectrum disorder: a systematic review. *Annals Of Translational Medicine*, 7 (23), 792.
122. Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R. D. (2012). Networking in autism: leveraging genetic, biomarker and model system findings in the search for new treatments. *Neuropsychopharmacology*, 37 (1), 196-212.

123. Lee, A., H. Choo, Jeon, B. (2022). Serotonin Receptors as Therapeutic Targets for Autism Spectrum Disorder Treatment. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23 (12).
124. Shah, P. A., Park, C. J., Shaughnessy, M. P., Cowles, R. A. (2021). Serotonin as a Mitogen in the Gastrointestinal Tract: Revisiting a Familiar Molecule in a New Role. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12 (3), 1093-1104.
125. Coon, H., Dunn, D., Lainhart, J., Miller, J., Hamil, C., Battaglia, A., Tancredi, R., Leppert, M. F., Weiss, R., McMahon, W. (2005). Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2). *American Journal Of Medical Genetics*, 135B (1), 42-6.
126. Zafeiriou, D. I., Ververi, A., Vargiami, E. (2009). The serotonergic system: its role in pathogenesis and early developmental treatment of autism. *Current Neuropsychopharmacology*, 7 (2), 150-7.
127. Anderson, G. M. (2015). Autism biomarkers: challenges, pitfalls and possibilities. *Journal Of Autism and Developmental Disorders*, 45 (4), 1103-13.
128. Rossignol, D. A., Frye, R. E. (2011). Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 53 (9), 783-792.
129. Lalanne, S., Leurent, C. F., Anderson, G. M., Schroder, C. M., Nir, T., Chokron, S., Delorme, R., Claustat, B., Bellissant, E., Kermarrec, S., Franco, P., Deniz, L., Tordjman, S. (2021). Melatonin: From Pharmacokinetics to Clinical Use in Autism Spectrum Disorder. *Interbational Journal Of Molecular Sciences*, 22 (3).
130. Tordjman, S., Najjar, I., Bellissant, E., Anderson, G. M., Barburoth, M., Cohen, D., Jaafari, N., Schischmanoff, O., Fagard, R., Lagdas, E., Kermarrec, S., Ribardiere, S., Botbo, M., Fougrou, C., Bronsard, G., Vernay-Leconte, J. (2013). Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. *International Journal Molecular Sciences*, 14 (10), 20508-42.
131. Bjorklund, G., Meguid, N. A., El-Bana, M. A., Tinkov, A. A., Saad, K., Dadar, M., Hemimi, M., Skalny, A. V., Hosnedlova, B., Kizek, R., Osredkar, J., Urbina, M. A., Fabjan, T., El-Houfey, A. A., Gatarek, P., Chirumbolo, S. (2020). Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology*, 57 (5), 2314-2332.
132. Liu, X., Lin, J., Zhang, H., Khan, N. U., Zhang, J., Tang, X., Cao, X., Shen, L. (2022). Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder-Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. *Frontiers In Psychiatry*, 13, 813304.
133. Bjorklund, G., Tinkov, A. A., Hosnedlova, B., Kizek, R., Ajsuvakova, O. P., Chirumbolo, S., Skalnaya, M. G., Peana, M., Dadar, M., El-Ansary, A., Quasem, H., Adams, J. B., Aaseth, J., Skalny, A. V. (2020). The role of glutathione redox imbalance in autism spectrum disorder: A review. *Free Radical Biology Medicine*, 160, 149-162.
134. Bjorklund, G., Doşa, M. D., Maes, M., Dadar, M., Frye, R. E., Peana, M., Chirumbolo, S. (2021). The impact of glutathione metabolism in autism spectrum disorder. *Pharmacological Research*, 166, 105437.

135. Mandic-Maravic, V., Mitkovic-Voncina, M., Pljesa-Ercegovac, M., Savic-Radojevic, A., Djordjevic, M., Ercegovac, M., Pekmezovic, T., Simic, T., Pejovic-Milovancevic, M. (2021). Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Clinical Characteristics in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers In Psychiatry*, 12, 672389.
136. Carter, C. S., Kenkel, W. M., MacLean, E. L., Wilson, S. R., Perkeybile, A. M., Yee, J. R., Ferris, C. F., Nazarloo, H. P., Porges, S. W., Davis, J. M., Connelly, J. J., Kingsbury, M. A. (2020). Is Oxytocin "Nature's Medicine"? *Pharmacology Reviews*, 72 (4), 829-861.
137. Jack, A., Connelly, J. J., Morris, J. P. (2012). DNA methylation of the oxytocin receptor gene predicts neural response to ambiguous social stimuli. *Frontiers In Human Neuroscience*, 6, 280.
138. Jacob, S., Brune, C. W., Carter, C. S., Leventhal, B. L., Lord, C., Cook, E. H. (2007). Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. *Neuroscience Letters*, 417 (1), 6-9.
139. Frye, R. E. (2018). Social Skills Deficits in Autism Spectrum Disorder: Potential Biological Origins and Progress in Developing Therapeutic Agents. *CNS Drugs*, 32 (8), 713-734.
140. Madore, C., Leyrolle, Q., Lacabanne, C., Benmamar-Badel, A., Joffre, C., Nadjar, A., Laye, S. (2016). Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plasticity*, 2016, 3597209.
141. Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., Water, J. V. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior and Immunity*, 25 (1), 40-5.
142. Onore, C., Careaga, M., Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior and Immunity*, 26 (3), 383-92.
143. Bjorklund, G., Meguid, N. A., El-Ansary, A., El-Bana, M., Dadar, M., Aaseth, J., Hemimi, M., Osredkar, J., Chirumbolo, S. (2018). Diagnostic and Severity-Tracking Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. *Journal Of Molecular Neuroscience*, 66 (4), 492-511.
144. Zerbo, O., Yoshida, C., Grether, J. K., Water, J. V., Ashwood, P., Delorenze, G. N., Hansen, R. L., Kharrazi, M., Croen, L. A. (2014). Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study. *Journal Of Neuroinflammation*, 11, 113.
145. Ravaccia, D. Ghafourian, T. (2020). Critical Role of the Maternal Immune System in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *Biomedicines*, 8 (12).
146. Meltzer, A., Water, J. V. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42 (1), 284-298.

147. Marchetto, M. C., Belinson, H., Tian, Y., Freitas, B. C., Fu, C., Vadodaria, K., Beltrao-Braga, P., Trujillo, C. A., Mendes, A. P. D., Padmanabhan, K., Nunez, Y., Ou, J., Ghosh, H., Wright, R., Brennand, K., Pierce, K., Eichenfield, L., Pramparo, T., Eyler, L., Barnes, C. C., Courchesne, E., Geschwind, D. H., Gage, F. H., Wynshaw-Boris, A., Muotri, A. R. (2017). Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Molecular Psychiatry*, 22 (6), 820-835.
148. Linker, S. B., Mendes, A. P. D., Marchetto, M. C. (2020). IGF-1 treatment causes unique transcriptional response in neurons from individuals with idiopathic autism. *Molecular Autism*, 11 (1), 55.
149. Sharma, A., Bhalla, S., Mehan, S. (2022). PI3K/AKT/mTOR signalling inhibitor chrysophanol ameliorates neurobehavioural and neurochemical defects in propionic acid-induced experimental model of autism in adult rats. *Metabolic Brain Disease*, 37 (6), 1909-1929.
150. Takeuchi, K., Gertner, M. J., Zhou, J., Parada, L. F., Bennett, M. V. L., Zukin, R. S. (2013). Dysregulation of synaptic plasticity precedes appearance of morphological defects in a Pten conditional knockout mouse model of autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (12), 4738-43.
151. Oztan, O., Jackson, L. P., Libove, R. A., Sumiyoshi, R. D., Philips, J. M., Garner, J. P., Hardan, A. Y., Parker, K. J. (2018). Biomarker discovery for disease status and symptom severity in children with autism. *Psychoneuroendocrinology*, 89, 39-45.
152. Francis, S. M., Sagar, A., Levin-Decanini, T., Liu, W., Carter, C. S., Jacob, S. (2014). Oxytocin and vasopressin systems in genetic syndromes and neurodevelopmental disorders. *Brain Research*, 1580, 199-218.
153. Abou-Donia, M. B., Suliman, H. B., Siniscalco, D., Antonucci, N., ElKafrawy, P. (2019). De novo Blood Biomarkers in Autism: Autoantibodies against Neuronal and Glial Proteins. *Behavioral Sciences*, 9 (5).
154. Corbett, B. A., Kantor, A. B., Schulman, H., Walker, W. L., Ashwood, P., Rocke, D. M., Sharp, F. R. (2007). A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Molecular Psychiatry*, 12 (3), 292-306.
155. Jansakova, K., Kyselicova, K., Ostatnikova, D., Repiska, G. (2021). Potential of Salivary Biomarkers in Autism Research: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (19).
156. Hicks, S. D., Rajan, A. T., Wagner, K. E., Barns, S., Carpenter, R. L., Middleton, F. A. (2018). Validation of a Salivary RNA Test for Childhood Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics*, 9, 534.
157. Wang, Y., Zhang, J., Song, W., Tian, X., Liu, Y., Wang, Y., Ma, J., Wang, C., Yan, G. (2021). A proteomic analysis of urine biomarkers in autism spectrum disorder. *Journal of Proteomics*, 242, 104259.

158. Dieme, B., Mavel, S., Blasco, H., Tripi, G., Bonnet-Brilhault, F., Malvy, J., Bocca, C., Andres, C. R., Nadal-Desbarats, L., Emond, P. (2015). Metabolomics Study of Urine in Autism Spectrum Disorders Using a Multiplatform Analytical Methodology. *Journal of Proteome Research*, 14 (12), 5273-82.
159. Wang, H., Liang, S., Wang, M., Gao, J., Sun, C., Wang, J., Xia, W., Wu, S., Sumner, S. J., Zhang, F., Sun, C., Wu, L. (2016). Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism. *Journal of Psychiatry Neuroscience*, 41 (1), 27-37.
160. Stubbs, E. G., Crawford, M. L. (1977). Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 7 (1), 49-55.
161. Tural Hesapcioglu, S., Kasak, M., Cıta Kurt, A. N., Ceylan, M. F. (2017). High monocyte level and low lymphocyte to monocyte ratio in autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Disabilities*, 65 (2), 73-81.
162. Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 75-90.
163. Coban, N., Gokcen, C., Akbayram, S., Caliskan, B. (2019). Evaluation of Platelet Parameters in Children with Autism Spectrum Disorder: Elongated Collagen-Adenosine Diphosphate and Collagen-Epinephrine Closure Times. *Autism Research*, 12 (7), 1069-1076.
164. Sweeten, T. L., Posey, D. J., McDougale, C. J. (2003). High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 160 (9), 1691-3.
165. Howsmon, D. P., Vargason, T., Rubin, R. A., Delhey, L., Tippet, M., Rose, S., Bennuri, S. C., Slattery, J. C., Melnyk, S., Jaames, S. J., Frye, R. E., Hahn, J. (2018). Multivariate techniques enable a biochemical classification of children with autism spectrum disorder versus typically-developing peers: A comparison and validation study. *Bioengineering & Translational Medicine*, 3 (2), 156-165.
166. Vargason, T., Kruger, U., Roth, E., Delhey, L. M., Tippet, M., Rose, S., Bennuri, S. C., Slattery, J. C., Melnyk, S., James, S. J., Frye, R. E., Hahn, J. (2018). Comparison of Three Clinical Trial Treatments for Autism Spectrum Disorder Through Multivariate Analysis of Changes in Metabolic Profiles and Adaptive Behavior. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 12, 503.
167. Uddin, L. Q., Menon, V., Young, C. B., Ryali, S., Chen, T., Khouzam, A., Minshew, N. J., Hardan, A. Y. (2011). Multivariate searchlight classification of structural magnetic resonance imaging in children and adolescents with autism. *Biological Psychiatry*, 70 (9), 833-41.
168. Kala, S., Rolison, M. J., Trevisan, D. A., Naples, A. J., Pelphrey, K., Ventola, P., McPartland, J. C. (2021). Brief Report: Preliminary Evidence of the N170 as a Biomarker of Response to Treatment in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers In Psychiatry*, 12, 709382.

169. Jensen, A. R., Lane, A. L., Werner, B. A., McLees, S. E., Fletcher, T. S., Frye, R. E. (2022). Modern Biomarkers for Autism Spectrum Disorder: Future Directions. *Molecular Diagnosis Therapy*, 26 (5), 483-495.
170. Kang, E., Keifer, C. M., Levy, E. J., Foss-Feig, J., McPartland, J. C., Lerner, M. D. (2018). Atypicality of the N170 Event-Related Potential in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 3 (8), 657-666.
171. Sacco, R., Gabriele, S., Persico, A. M. (2015). Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, 234 (2), 239-51.
172. Zhang, J., Lin, J., Zhao, X., Yao, F., Feng, C., He, Z., Cao, X., Gao, Y., Khan, N. U., Chen, M., Luo, P., Shen, L. (2022). Trace Element Changes in the Plasma of Autism Spectrum Disorder Children and the Positive Correlation Between Chromium and Vanadium. *Biological Trace Element Research*, 200 (12), 4924-4935.
173. Macedoni-Luksic, M., Gosar, D., Bjorklund, G., Orazem, J., Kodric, J., Lesnik-Musek, P., Zupancic, M., France-Stiglic, A., Sesek-Briski, A., Neubauer, D., Osredkar, J. (2015). Levels of metals in the blood and specific porphyrins in the urine in children with autism spectrum disorders. *Biological Trace Element Research*, 163 (1-2), 2-10.
174. Neal, A. P., Guilarte, T. R. (2010). Molecular neurobiology of lead (Pb(2+)): effects on synaptic function. *Molecular Neurobiology*, 42 (3), 151-60.
175. Shilpa, O., Anupama, K. P., Antony, A., Gurushankara, H. P. (2021). Lead (Pb)-induced oxidative stress mediates sex-specific autistic-like behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Neurobiology*, 58 (12), 6378-6393.
176. Hu, Y., Ehli, E. A., Boomsma, D. I. (2017). MicroRNAs as biomarkers for psychiatric disorders with a focus on autism spectrum disorder: Current progress in genetic association studies, expression profiling, and translational research. *Autism Research*, 10 (7), 1184-1203.
177. Rose, S., Niyazov, D. M., Rossignol, D. A., Goldenthal, M., Kahler, S. G., Frye, R. E. (2018). Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Diagnosis Therapy*, 22 (5), 571-593.
178. Marotta, R., Risoleo, M. C., Messina, G., Parisi, L., Carotenuto, M., Vetri, L., Roccella, M. (2020). The Neurochemistry of Autism. *Brain Sciences*, 10 (3), 163.
179. Howes, O. D., Rogdaki, M., Findon, J. L., Wichers, R. H., Charman, T., King, B. H., Loth, E., McAlonan, G. M., McCracken, J. T., Parr, J. R., Povey, C., Santosh, P., Wallace, S., Simonoff, E., Murphy, D. G. (2018). Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 32 (1), 3-29.
180. Dhossche, D., Applegate, H., Abraham, A., Maertens, P., Bland, L., Bencsath, A., Martinez, J. (2002). Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Medical Science Monitor*, 8 (8), PR1-6.



181. Siracusano, M., Riccioni, A., Abate, R., Benvenuto, A., Curatolo, P., Mazzone, L. (2020). Vitamin D Deficiency and Autism Spectrum Disorder. *Curren Pharmaceutical Design*, 26 (21), 2460-2474.
182. Cardoso, B. R., Roberts, B. R., Bush, A. I., Hare, D. J. (2015). Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. *Metallomics*, 7 (8), 1213-28.
183. Wu, H., Zhao, G., Liu, S., Zhang, Q., Wang, P., Cao, Y., Wu, L. (2022). Supplementation with selenium attenuates autism-like behaviors and improves oxidative stress, inflammation and related gene expression in an autism disease model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 107, 109034.
184. Gvozdjakova, A., Kucharska, J., Ostatnikoca, D., Babinska, K., Nakladal, D., Crane, F. L. (2014). Ubiquinol improves symptoms in children with autism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 798957.
185. Roberts, T. P. L., Kuschner, E. S., Edgar, J. C. (2014). Biomarkers for autism spectrum disorder: opportunities for magnetoencephalography (MEG). *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 13 (1), 34.
186. Hellmer, K. Nystrom, P. (2017). Infant acetylcholine, dopamine, and melatonin dysregulation: Neonatal biomarkers and causal factors for ASD and ADHD phenotypes. *Medical Hypotheses*, 100, 64-66.
187. Rashaid, A. H. B., Alqhazo, M. T., Nusair, S. D., Adams, J. B., Bashtawi, M. A., Al-Fawares, O. (2022). Profiling plasma levels of thiamine and histamine in Jordanian children with autism spectrum disorder (ASD): potential biomarkers for evaluation of ASD therapies and diet. *Nutritional Neuroscience*, 28, 1-8.
188. Nicolini, C. Fahnestock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, 299 (Pt A), 217-227.
189. Chaliha, D., Albrecht, M., Vaccarezza, M., Takechi, R., Lam, V., Al-Salami, H., Mamo, J. (2020). A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental Neuroscience*, 42 (1), 12-48.
190. Vonck, K., Raedt, R., Naulaerts, J., Vogelaere, F. D., Thiery, E., Roost, D. V., Aldenkamp, B., Miatton, M., Boon, P. (2014). Vagus nerve stimulation...25 years later! What do we know about the effects on cognition? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 45, 63-71.
191. Roosevelt, R. W., Smith, D. C., Clough, R. W., Jensen, R. A., Browning, R. A. (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Research*, 1119 (1), 124-32.
192. George, M. S., Ward, H. E., Ninan, P. T., Pollack, M., Nahas, Z., Anderson, B., Kose, S., Howland, R. H., Googman, W. K., Ballenger, J. C. (2008). A pilot study of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant anxiety disorders. *Brain Stimulation*, 1 (2), 112-21.

193. Ruffoli, R., Giorgi, F. S., Pizzanelli, C., Murri, L., Papareli, A., Fornai, F. (2011). The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42 (4), 288-96.
194. van Hoorn, A., Carpenter, T., Oak, K., Laugharne, R., Ring, H., Shankar, R. (2019). Neuromodulation of autism spectrum disorders using vagal nerve stimulation. *Journal of Clinical Neuroscience*, 63, 8-12.
195. Wang, Z., Yuan, X., Zhang, Q., Wen, J., Cheng, T., Quin, X., Ji, T., Shu, X., Jiang, Y., Liao, J., Hao, H., Li L., Wu, Y. (2022). Effects of Stable Vagus Nerve Stimulation Efficacy on Autistic Behaviors in Ten Pediatric Patients With Drug Resistant Epilepsy: An Observational Study. *Frontiers Pediatrics*, 10, 846301.
196. Levy, M. L., Levy, K. M., Hoff, D., Amar, A. P., Park, M. S., Conklin, J. M., Baird, L., Apuzzo, M. L. J. (2010). Vagus nerve stimulation therapy in patients with autism spectrum disorder and intractable epilepsy: results from the vagus nerve stimulation therapy patient outcome registry. *Journal of Neurosurgery Pediatrics*, 5 (6), 595-602.
197. Kumaria, A. Sitaraman, M. (2019). Can vagus nerve stimulation improve social cognition in autism? *Cortex*, 115, 350-351.
198. Bonaz, B., Sinniger, V., Pellissier, S. (2016). Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *The Journal of Physiology*, 594 (20), 5781-5790.
199. Kinsbourne, M., The Immune system's moderating response to inflammation relieves autistic behavior: response to Peter Good. *Neuropsychology Review*, 21 (1), 68-9.
200. Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405 (6785), 458-62.
201. Falvey, A., Vagus nerve stimulation and inflammation: expanding the scope beyond cytokines. *Bioelectronic Medicine*, 8 (1), 19.
202. Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., Guastella, A. J. (2015). Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 20 (4), 440-6.
203. Ouyang, W., O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50 (4), 871-891.
204. Careaga, M., Rogers, S., Hansen, R. L., Amaral, D. G., Water, J. V., Ashwood, P. (2017). Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 81 (5), 434-441.
205. Jyonouchi, H., Sun, S., Le, H. (2001). Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of Neuroimmunology*, 120 (1-2), 170-9.

206. Pecorelli, A., Cervellati, F., Belmonte, G., Montagner, G., Waldon, P., Hayek, J., Gambari, R., Valacchi, G. (2016). Cytokines profile and peripheral blood mononuclear cells morphology in Rett and autistic patients. *Cytokine*, 77, 180-8.
207. Garcia-Oscos, F., Pena, D., Housini, M., Cheng, D., Lopez, D., Borland, M. S., Salgado-Delgado, R., Salgado, H., D'Mello, S., Kilgard, M. P., Rose-John, S., Atzori, M. (2015). Vagal nerve stimulation blocks interleukin 6-dependent synaptic hyperexcitability induced by lipopolysaccharide-induced acute stress in the rodent prefrontal cortex. *Brain Behavior and Immunity*, 43, 149-58.
208. Szabo, D., Tod, P., Goloncser, F., Roman, V., Lendvai, B., Otrókoci, L., Sperlagh, B. (2022). Maternal P2X7 receptor inhibition prevents autism-like phenotype in male mouse offspring through the NLRP3-IL-1 $\beta$  pathway. *Brain Behavior and Immunity*, 101, 318-332.
209. Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X., Ji, L., Brown, T., Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology*, 207 (1-2), 111-6.
210. Wei, H., Alberts, I., Li, X. (2013). Brain IL-6 and autism. *Neuroscience*, 252, 320-5.
211. Dudakov, J. A., Hanash, A. M., van den Brink, M. R. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual Review Immunology*, 33, 747-85.
212. Moaaz, M., Youssry, S., Elfatry, A., Rahman, M. A. E. (2019). Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$ ) in children with autism spectrum disorder. *Journal of Neuroimmunology*, 337, 577071.
213. Saresella, M., Piancone, F., Marventano, I., Zoppis, M., Hernis, A., Zanette, M., Trabattoni, D., Chiappedi, M., Ghezzi, A., Canevini, M. P., Rosa, F. I., Esposito, S., Clerici, M. (2016). Multiple inflammasome complexes are activated in autistic spectrum disorders. *Brain Behavior and Immunity*, 57, 125-133.
214. Schroder, K., Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140 (6), 821-32.
215. Shao, B. Z., Xu, Z. Q., Han, B. Z., Su, D. F., Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers In Pharmacology*, 6, 262.
216. Shen, Y., Qian, L., Luo, H., Li, X., Ruan, Y., Fan, R., Si, Z., Chen, Y., Li, L., Liu, Y. (2022). The Significance of NLRP Inflammasome in Neuropsychiatric Disorders. *Brain Sciences*, 12 (8), 1057.
217. Zhao, P., Fu, H., Cheng, H., Zheng, R., Yuan, D., Yang, J., Li, S., Li, E., Li, Li. (2022). Acupuncture at ST36 Alleviates the Behavioral Disorder of Autistic Rats by Inhibiting TXNIP-Mediated Activation of NLRP3. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 81 (2), 127-134.
218. Tang, Y., Dong, X., Chen, G., Ye, W., Kang, J., Tang, Y., Feng, Z. (2020). Vagus Nerve Stimulation Attenuates Early Traumatic Brain Injury by Regulating the NF- $\kappa$ B/NLRP3 Signaling Pathway. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 34 (9), 831-843.

219. Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., Duan, G. (2020). Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*, 12 (4), 372.
220. Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Rettori, V., McCann, S. M., Licinio, J. (1997). Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10, and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1), 227-32.

**EKLER**

## EK-1. Etik Kurul Onayı

Zıvrak Tarih ve Sayısı: 18.05.2021-E.86096



**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

Sayı : E-66332047-604.01.02-86096  
Konu : Değerlendirme ve Onay

18.05.2021

**Sayın Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU**  
**Anatomi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi**

Araştırmacı grubu Meltem BAHÇELİOĞLU, Neslihan BUKAN, Ece ALİM, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR, Hale GÖK DAĞIDIR'dan oluşan, G.Ü.ET-21.031 kod numaralı ve "*Deneyssel Otistik Fare Modelinde, Transauriküler Nervus Vagus Stimülasyonunun Pro-İnflamatuvar ve Antiİnflamatuvar Sitokinler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.031 and entitled "*Investigation of the Transauricular Vagal Nerve Stimulation Effects in Experimental Autistic Mice Model on pro and Anti-Inflammatory Cytokines* " is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

NOT: Daha önce onay alan 20.029 kod no'lu çalışmada kullanılan 30 adet C57BL/6 Fare'nin dokuları kullanılacaktır.

**Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ**  
**Kurul Başkanı**

Ek:1 Liste

## EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

| GAZİ ÜNİVERSİTESİ<br>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM<br>LİSTESİ |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| TOPLANTI TARİHİ : 16/04/2021                                                        | TOPLANTI SAYISI : 03 |
| ADI-SOYADI                                                                          | İMZA                 |
| Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ<br>(Başkan)                                              |                      |
| Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL<br>(Başkan Yrd.)                                        |                      |
| Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU                                                               |                      |
| Prof.Dr.Tuncay PEKER                                                                |                      |
| Prof.Dr.Fatma AKAR                                                                  |                      |
| Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK                                                         |                      |
| Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ                                                          |                      |
| Doç.Dr.Emre BARIŞ                                                                   |                      |
| Doç.Dr.İpek SÜNTAR                                                                  |                      |
| Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR                                                            |                      |
| Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER                                                              |                      |
| Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM                                                               |                      |
| Vet.Hek.Burcu AVCI                                                                  |                      |
| Osman İÇ                                                                            |                      |

## EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası





## EK-3. BAP Proje Kabul Evrakı



TC  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
(Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

**Konu:**Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih  
19.08.2021

**Sayın : Prof.Dr. MELTEM BAHÇELİOĞLU**

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. RAMAZAN BAYINDIR  
Koordinatör

Proje Başlığı: Deneysel otizm modelinde transaurikular nervus vagus stimülasyonunun proinflatuar ve antiinflatuar sitokinler üzerine etkilerinin incelenmesi

Proje No: TDK-2021-7245

Proje Türü: Doktora

Süresi: 18 ay

Başlama Tarihi: 19.08.2021

Onaylanan Bütçesi: 49982,70 TL

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. MELTEM BAHÇELİOĞLU

Araştırmacı(lar): PROF.DR. NESLIHAN BUKAN, ÖĞRENCİ HALE GÖK DAĞIDIR

## EK-4. Dokuları Kullanılan Araştırmanın G.Ü.ET-20.029 Kod Numaralı Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 22.06.2020-E.64708



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-  
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU  
Anatomi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Meltem BAHÇELİOĞLU, Rabet GÖZİL, Suna ÖMEROĞLU, Neslihan BUKAN, Özen AKARCA, Ece ALİM, E.Deniz BARÇ, Ayşen ÇALIKUŞU, Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA, Hasan KILINÇ, Hale GÖK DAĞIDIR ve Merve Sevgi İNCE'den oluşan G.Ü.ET-20.029 kod numaralı ve "Deneyisel Otistik Fare Modelinde, Transauriküler Nervus Vagus Stimulasyonunun Sinir Sistemi Gelişimi ve Morfolojisi, İmmünolojik ve Biyokimyasal Belirteçler ile Davranış Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.029 and entitled "Investigation of the Transauricular Vagal Nerve Stimulation Effects, in Experimental Autistic Mice Model, on Nervous System Development and Morphology, Immunological and Biochemical Biomarkers and Behavior" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır  
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ  
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : C57BL/6 fare  
Hayvan Sayısı : 30

Ek: 1 Liste



EK-4. (devam) Dokuları Kullanılan Araştırmanın G.Ü.ET-20.029 Kod Numaralı Etik Kurul Onayı

| GAZİ ÜNİVERSİTESİ<br>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM<br>LİSTESİ |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| TOPLANTI TARİHİ :25/02/2020                                                         | TOPLANTI SAYISI : 03 |
| ADI-SOYADI                                                                          | İMZA                 |
| Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ<br>(Başkan)                                              |                      |
| Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL<br>(Başkan Yrd.)                                        |                      |
| Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU                                                               |                      |
| Prof.Dr.Tuncay PEKER                                                                |                      |
| Prof.Dr.Fatma AKAR                                                                  |                      |
| Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIÇIK                                                          |                      |
| Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ                                                          |                      |
| Doç.Dr.Emre BARIŞ                                                                   |                      |
| Doç.Dr.İpek SÜNTAR                                                                  |                      |
| Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR                                                            |                      |
| Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER                                                              |                      |
| Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM                                                               |                      |
| Vet.Hek.Burcu AVCI                                                                  |                      |
| Osman İÇ                                                                            |                      |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GÖK DAĞIDIR Hale  
Uyruğu : T.C.

| Eğitim Derecesi | Eğitim Birimi                                                              | Mezuniyet tarihi       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Doktora         | Gazi Üniversitesi/Tıbbi Biyokimya<br>İnsan Beyni ve Nörobilim YÖK 100/2000 | Devam ediyor           |
| Yüksek lisans   | Gazi Üniversitesi/Tıbbi Biyokimya                                          | 2018                   |
| Lisans          | Mersin Üniversitesi/Biyoloji                                               | 2012                   |
|                 | Carl Von Ossietzky Üniversitesi /Biyoloji                                  | 2009-2010<br>(Erasmus) |
| Lise            | Eryaman Lisesi                                                             | 2006                   |

### İş Deneyimi

| Yıl        | Yer                                                 | Görev    |
|------------|-----------------------------------------------------|----------|
| 2014-2019  | İller Bankası Özel Eğitim<br>ve İş Uygulama Merkezi | Öğretmen |
| 2013- 2014 | HRS Ankara Kadın<br>Hastanesi Tüp Bebek             | Biyolog  |

### Yabancı Dil

- İngilizce
- Almanca

### Sertifikalar

Pedagojik Formasyon – Gazi Üniversitesi

Hücre Kültürü ve Sonrası Araştırma Yöntemleri- Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi

Western Blot ve Elisa Analizi- Atlas Biyoteknoloji

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – Gazi Üniversitesi GÜDAM

## Yayınlar

- 1) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Arhan, E., Tombul, N., Arslan, B., Temel, E.Ü.( 2020). Autism And Vitamin D. Journal of Gazi University Health Sciences Institute. 2020,2687-6353, 2, 1, 28-35.
- 2) Dağıdır, H.G.,Bukan, N. (2017).Otizm ve Beslenme, Sözlü Sunum, 1. Gazi Tıp Biyokimya Günleri Obeziteye Multidisipliner Yaklaşım, 23 ekim 2017, 24 ekim 2017.
- 3) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Dikmen, A.U. (2019). Nutritional habits in children with autism and cerebral palsy and its evaluation with biochemical approaches. Turkish Journal of Biochemistry, 2019,44(3),97.
- 4) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Arhan, E., Tombul, N., Arslan, B., Temel, E.Ü. (2019). Retrospective Evaluation Of Routine Biochemical Blood Parameters in Children With Autism. Gevher Nesibe 4. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi Tam Metin Kitabı,2019,4, 229-233.
- 5) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Arhan, E., Tombul, N., Temel, E.Ü.( 2020). Retrospective evaluation of routine biochemical blood parameters in children with cerebral palsi, Tam Metin Bildiri, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 19 Mart 2020, 20 Mart 2020, 29 - 33.
- 6) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Arhan, E., Tombul, N., Arslan, B., Temel, E.Ü.( 2020). Retrospective evaluation of routine hematology blood parameters in children with autism, Tam Metin Bildiri, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 19 Mart 2020, 20 Mart 2020, 34 - 39.
- 7) Dağıdır,H.G, Ağacan, G., Ercan,B.E., Tombul, N., Bukan, N. (2020). Retrospective comparison of patients with Covid-19 and normal individuals in terms of biochemistry parameters, 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, 18 Aralık 2020, 20 Aralık 2020, 1303-829X, 45, 2, 34 – 34.
- 8) Tombul, N., Bukan, N., Dağıdır, H.G., Arslan, B. (2020). PRP izolasyonu ve metodlarının karşılaştırılması, Poster Sunumu, Uluslararası Laboratuvar Tıbbı ve 20. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 25 Aralık 2020, 26 Aralık 2020, 1304-0790, 18, 302 - 302.
- 9) Ercan, B.E., Dağıdır, H.G., Ağacan, G., Tombul, N., Bukan, N. (2020). Covid-19 hastaları ile normal bireylerin hematoloji parametreleri açısından retrospektif olarak karşılaştırılması,

Sözlü Sunum, Uluslararası Laboratuvar Tıbbı ve 20. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 25 Aralık 2020, 26 Aralık 2020, 1304-0790, 18, 188 - 188.

10) Dağıdır, H.G., Osmanow, Z., Ağacan, G., Ercan, B.E., Bukan, N. (2021). COVID19'lu Bireyler ile Normal Bireylerin Vitamin D Düzeylerinin Retrospektif Olarak Karşılaştırılması, Tam Metin Bildiri, 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021), 24 Kasım 2021, 26 Kasım 2021, 470 - 477.

11) Serin, D.S., Dağıdır, H.G., Gökgöz, S., Bukan, N. (2021). Retrospective Comparison of Full Urine Examination Levels of Covid-19 Individuals and Normal Individuals, Poster Sunumu, 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021), 24 Kasım 2021, 26 Kasım 2021, 1144 - 1144.

12) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Bahçelioğlu, M. (2022). Otizm Ve İnflamasyon Ekseni, Sözlü Sunum, 2. Gazi Tıp Biyokimya Günleri İnflamasyona Multidisipliner Yaklaşım, 24 Kasım, 25 Kasım 2022.

13) Dağıdır, H.G., Bukan, N., Bahçelioğlu, M. (2022). Otizmin Etiyolojisi, Future Biochemistry and Bioscience, 2022, 2757-6604, 4, 2, 49-57. <http://doi.org/10.48086/ASD0042>



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*

