



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

**DOKTORA
TEZİ**

**DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER
NERVUS VAGUS STİMÜLASYONUNUN SİNİR SİSTEMİ GELİŞİMİ
VE MORFOLOJİSİ, İMMÜNOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
BELİRTEÇLER İLE DAVRANIŞ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

AYŞEN ÇALIKUŞU

NÖROBİLİM PROGRAMI

ŞUBAT 2024



**DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER NERVUS
VAGUS STİMÜLASYONUNUN SINIR SİSTEMİ GELİŞİMİ VE
MORFOLOJİSİ, İMMÜNOLOJİK VE BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER
İLE DAVRANIŞ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ayşen ÇALIKUŞU

**DOKTORA TEZİ
NÖROBİLİM PROGRAMI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşen ÇALIKUŞU
20/02/2024

DENEYSEL OTİSTİK FARE MODELİNDE TRANSAURİKÜLER NERVUS VAGUS
STİMÜLASYONUNUN SİNİR SİSTEMİ GELİŞİMİ VE MORFOLOJİSİ,
İMMÜNOLOJİK VE BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER İLE DAVRANIŞ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Ayşen ÇALIKUŞU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2024

ÖZET

Otizm spektrum bozukluğu, erkekler arasında daha sık görülen ve tedavi seçeneklerinin az olduğu karmaşık nörogelişimsel bir bozukluktur. Bilateral transauriküler vagal sinir stimülasyonunun davranışlar ve nörogelişimsel proteinler üzerindeki etkisini araştırmak için maternal valproik asit (12,5. gün, oral, 600 mg/kg) kaynaklı otizm modeli kullandık. C57BL/6 farelerinin otistik benzeri davranışları bazal testlerde değerlendirildi ve üç hafta boyunca haftada iki kez transauriküler vagal sinir stimülasyonu uygulandı. Sosyalite ve kaygı değerlendirmeleri üç odalı sosyalite ve sosyal yenilik testi, ayna oda testi, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirenti kullanılarak yapıldı. Beyin kesitlerinde nöronların morfolojik açıdan incelenmesi amacıyla krezil viyole, apoptotik ve immünolojik süreçler ile aktif kaspaz-3 (CASP-3) ve nöroplastisite süreçleri değerlendirilmiş, ayrıca Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF) ve Doublecortin (DCX) boyamaları yapıldı. VPA'lı annelerden doğan otistik erkek farelerin; sosyalite parametreleri, açık kolda kalma yüzdesi ve giriş sayısı, merkez ayna oranı ve merkez alanlarda kalma süreleri düşüktü. Ek olarak, hücre yoğunluğu azalmış ve aktif CASP-3 aktivitesi artmıştı. BDNF ve DCX ekspresyonu ve miktarı azalmıştı. tVNS tarafından anlamlı derecede tüm parametreler kontrollere yaklaştı. Western blotting analizi, BDNF ve DCX düzeylerinde önemli bir modülasyonu ortaya çıkardı. Otizm spektrum bozukluğunun tanısında davranışsal parametreler ön plandadır ve güvenilir bir biyobelirteç belirlenmemiştir. Araştırmamızın bulguları, özellikle davranışsal iyileşmeler, vagal sinir stimülasyonunun umut verici olduğunu göstermektedir. tVNS, sosyal uyum, kaygı ve nöroplastisite süreçlerinde, otizm semptomları için umut verici, non-invaziv bir tedavi yaklaşımıdır.

Bilim Kodu : 10105.6
Anahtar Kelimeler : Otizm Spektrum Bozukluğu, Vagus Sinir Stimülasyonu, davranış deneyleri, DCX, BDNF
Sayfa Adedi : 90
Danışman : Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU
İkinci Danışman : Prof. Dr. Elvan ANADOL

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

(Ph. D. Thesis)

Ayşen ÇALIKUŞU

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2024

ABSTRACT

Autism spectrum disorder is a complex neurodevelopmental disorder that is more common among men and for which treatment options are few. We used a maternal valproic acid (day 12.5, oral, 600 mg/kg)-induced autism model to investigate the effect of bilateral transauricular vagal nerve stimulation on behaviors and neurodevelopmental proteins. C57BL/6 mice were evaluated at baseline for autistic-like behavior and received transauricular vagal nerve stimulation twice weekly for three weeks. Sociability and anxiety assessments were made using the three-room sociability and social novelty test, the mirror room test, the open field test, and the elevated plus maze. In the brain sections, to analyze the neurons morphologically, creyl violet, apoptotic and immunological processes and also, cleaved caspase-3 and neuroplasticity processes were evaluated, in addition Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Doublecortin (DCX) staining were performed. Autistic male mice born to mothers with VPA; Sociability parameters, percentage of staying in the open arm and number of entries, center mirror ratio and duration of stay in central areas were low. In addition, cell density decreased and cleaved AKTİF CASP-3 activity was increased. BDNF and DCX expression and amount were decreased. All parameters approached controls significantly by tVNS. Western blotting analysis revealed a significant modulation of BDNF and DCX levels. Behavioral parameters are at the forefront in the diagnosis of autism spectrum disorder and a reliable biomarker has not been determined. The findings of our research, particularly behavioral improvements, suggest that vagal nerve stimulation is promising. tVNS is a promising, non-invasive treatment approach for autism symptoms consisting of social adaptation, anxiety, and processes of neuroplasticity.

Science Code : 10105.6

Key Words : Autism Spectrum Disorder, Vagus Nerve Stimulation, behaviour tests, DCX, BDNF

Page Number : 90

Supervisor : Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU

Co-Supervisor : Prof. Dr. Elvan ANADOL

TEŞEKKÜR

Eğitimci kişiliği ve disiplini ile örnek alacağım, kendimi geliştirmem konusunda beni her zaman teşvik eden, şefkatle yaklaşan, bilgi ve desteklerini esirgemeyen, akademinin zor yollarında bana rehberlik eden, her zaman yanımda olan ve elimi tutan kıymetli danışmanlarım Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU'na ve Prof. Dr. Elvan ANADOL'a şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sabırlı ve yapıcı kişiliği ile bana örnek olan ve bu tez çalışmasının oluşturulmasında büyük emekleri olan değerli hocam Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN'e, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, Doç Dr. Doğa VURALLI'ya, Dr. Öğretim Üyesi Kerem ATALAR'a, Dr. Öğretim Üyesi Zeynep YIĞMAN'a ve Nörobilim Doktora Programında yer alan tüm değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Histolojik çalışmalarımda destekleri için Prof. Dr. Oğuz KUL ve ekibine teşekkür ederim.

Doktora yaşantımın ve Ankara'nın bana kattığı değerli dostlarım olan Öğr. Gör. Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA'ya ve Dr. Hasan KILINÇ'a teşekkür ederim.

Hayatımı kolaylaştırmak için tüm desteği ve çabasıyla bu zor yolda yürürken yanımda olan hayat arkadaşım Uzm. Dr. Arif Ahmet ÇALIKUŞU'na ve ben deney yaparken laboratuvarıda uyuyan ya da evdeyse yollarımı gözleyen, güzeller güzeli minik meleğim Ada Lina ÇALIKUŞU'na sonsuz teşekkür ederim.

Kıymetli annem, babam ve biricik kardeşim Yiğit KATISÖZ'e, sizlere beni çok sevdiğiniz ve her zaman desteklediğiniz için şükranlarımı sunarım.

Bu tezi biricik kızım Ada Lina ÇALIKUŞU'na ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu Tarihçesi	3
2.2. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanımı	4
2.3. Otizm Spektrum Bozukluğu Epidemiyolojisi ve Ekonomik Sonuçları	5
2.4. Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyolojisi	6
2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu Valproik Asit İlişkisi ve Hayvan Deneyleri.....	8
2.6. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Deney Grupları.....	13
3.2. Davranış Deneyleri.....	15
3.2.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi	15
3.2.2. Aynalı oda testi	16
3.2.3. Açık alan testi.....	17

3.2.4. Yükseltilmiş artı labirenti.....	17
3.3. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu Uygulaması.....	18
3.4. Histolojik İncelemeler	18
3.4.1. Kesitlerin krezil viyole boyama ve boyalı kesitlerin incelenmesi.....	19
3.4.2. Kesitlerin immün boyama prosedürü ve boyalı kesitlerin incelenmesi	20
3.5. Western Blotting Analizi.....	21
3.6. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. Davranış Deneyi Bulguları.....	23
4.1.1. Üç odalı sosyallık ve sosyal yenilik testi bulguları.....	23
4.1.2. Aynalı oda testi bulguları	29
4.1.3. Açık alan testi bulguları	32
4.1.4. Yükseltilmiş artı labirenti testi bulguları	34
4.2. Histolojik Bulgular.....	36
4.2.1. Krezil viyole boyalı kesitlerin analiz sonuçları.....	36
4.2.2. BDNF ve DCX ile işaretlenen kesitlerin immunreaktivite sonuçları.....	44
4.2.3. Aktif CASP-3 ile işaretlenen pfc kesitlerinin immünreaktivite sonuçları ..	57
4.3. Western Blotting Analiz Sonuçları	59
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER.....	91
ÖZGEÇMİŞ	93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyallik oturumunda odada kalma süreleri.....	23
Çizelge 4.2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyal yenilik oturumunda odada kalma süreleri	25
Çizelge 4.3. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyallik ve sosyal yenilik indeks sonuçları.....	26
Çizelge 4.4. Aynalı oda testi odalarda kalma süreleri	29
Çizelge 4.5. Aynalı oda testi merkez ayna oranı verileri	30
Çizelge 4.6. Açık alan testi verileri	32
Çizelge 4.7. Yükseltilmiş artı labirenti testi verileri	34
Çizelge 4.8. Krezil viyole ile boyalı kesitlerin hipokampus analiz verileri	38
Çizelge 4.9. Krezil viyole ile boyalı kesitlerin amigdala analiz verileri	39
Çizelge 4.10. Krezil viyole ile boyalı kesitlerin prefrontal korteks analiz verileri	42
Çizelge 4.11. BDNF ile boyanan hipokampus kesitleri immünreaktivite sonuçları	44
Çizelge 4.12. DCX ile boyanan hipokampus kesitleri immünreaktivite sonuçları.....	46
Çizelge 4.13. Amigdala alt bölgelerinin BDNF immünreaktivite analiz sonuçları.....	48
Çizelge 4.14. Amigdala alt bölgelerinin DCX immünreaktivite analiz sonuçları.....	50
Çizelge 4.15. Prefrontal korteks BDNF immünreaktivite analiz sonuçları.....	52
Çizelge 4.16. Prefrontal korteks DCX immünreaktivite analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.17. BDNF ve DCX protein miktarlarının western blotting analiz sonuçları	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi odada kalma süreleri.....	27
Şekil 4.2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi indeks değerleri	28
Şekil 4.3. Aynalı oda testi verileri.....	31
Şekil 4.4. Açık alan testi verileri.....	33
Şekil 4.5. Yükseltilmiş artı labirenti testi verileri	35
Şekil 4.6. Krezil viyole boyalı hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerinin sonuçları ..	38
Şekil 4.7. Krezil viyole boyalı amigdala kestileri analiz sonuçları.....	41
Şekil 4.8. Krezil viyole boyalı prefrontal korteks kesitleri analiz sonuçları.....	43
Şekil 4.9. Hipokampus BDNF immün boyama analiz sonuçları	45
Şekil 4.10. Hipokampus DCX immün boyama analiz sonuçları	47
Şekil 4.11. BDNF antikoruyla işaretli LA, BA, SA ve MA bölgeleri immünreaktivite analiz sonuçları.....	49
Şekil 4.12. DCX antikoruyla işaretli LA, BA, SA ve MA bölgeleri immünreaktivite analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.13. BDNF ve DCX antikorlarıyla işaretli prefrontal kortkes immünreaktivite analiz sonuçları	56
Şekil 4.14. Aktif CASP-3 antikoruyla işaretli prefrontal kortkes immünreaktivite analiz sonuçları.....	58
Şekil 4.15. Western blotting analiz sonuçları.....	60

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmanın akış şeması	14
Resim 3.2. Üç odalı sosyallık ve sosyal yenilik testi düzeneği	15
Resim 3.3. Aynalı oda testi düzeneği ve analizi.....	16
Resim 3.4. Açık alan testi düzeneği ve analizi.....	17
Resim 3.5. Yükseltilmiş artı labirenti testi düzeneği ve analizi	17
Resim 3.6. Transauriküler vagus sinir stimülasyon cihazı ve uygulaması.....	18
Resim 4.1. Hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerine ait krezil viyole boyalı kesit görüntüleri.....	35
Resim 4.2. Amigdala krezil viyole boyalı kesit görüntüleri	36
Resim 4.3. Prefrontal korteks krezil viyole boyalı kesit görüntüleri	39
Resim 4.4. Grupların BDNF antikoruyla işaretlenen hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgeleri görüntüleri.....	45
Resim 4.5. Grupların DCX antikoruyla işaretlenen hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgeleri görüntüleri.	47
Resim 4.6. Grupların BDNF antikorlarıyla işaretli amigdala görüntüleri.....	49
Resim 4.7. Grupların DCX antikorlarıyla işaretli amigdala görüntüleri.....	51
Resim 4.8. Grupların BDNF antikoruyla işaretli prefrontal korteks görüntüleri.....	53
Resim 4.9. Grupların DCX antikoruyla işaretli prefrontal korteks görüntüleri	55
Resim 4.10. Grupların kaspaz-3 antikoruyla işaretli prefrontal korteks görüntüleri.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

β

>

dk

<

μ m

°C

cm

%

Açıklamalar

Beta

Büyük

Dakika

Küçük

Mikrometre

Santigrat derece

Santimetre

Yüzde

Kısaltmalar

BDNF

AKTİF CASP-3

CN X

DCX

DSM

FVS

MSS

NDNV

NV

NTS

OSB

OSS

PFC

tVNS

VNS

VPA

Açıklamalar

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

Kaspaz-3

Nervus vagus

Doublecortin

Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı

Fetal Valproat Sendromu

Merkezi Sinir Sistemi

Nucleus Dorsalis Nervi Vagii

Nervus Vagus

Nucleus Tractus Solitarius

Otizm Spektrum Bozukluğu

Otonom Sinir Sistemi

Prefrontal korteks

Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu

Vagus Sinir Stimülasyonu

Valproik Asit

1. GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal etkileşimde ve iletişimde bozulma, stereotipik davranış bozukluklarıyla karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Erken çocukluk döneminde başlayan tekrarlayan ve basmakalıp davranışlar, anormal ya da karşılıksız kişilerarası iletişim ve bilişsel katılık/esneklik OSB'nin üç temel semptomudur [1,2,3]. Çocukların yaklaşık 44'de 1'i OSB tanısı almakta ve erkek çocuklarında kız çocuklarına oranla 4,2 kat daha fazla görüldüğü belirtilmektedir [4]. OSB'ye eşlik eden diğer semptomlar (uykusuzluk, anksiyete vb.) hafifletilebilse de kesin tedavisi bulunmamaktadır [5]. Kemirgenlerde OSB modeli oluşturmak için kullanılan maternal valproik asit (VPA) maruziyeti, otizm çalışmalarında en yaygın kullanılan modellerden biridir [5,6]. Otizmin etiolojisi kesin olarak aydınlatılamamıştır [7,8]. OSB'de nörobiyolojik mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemekte fakat prefrontal korteks, hipokampus, amigdala ve serebellum gibi beyin bölgelerindeki morfolojik farklılıklar hem klinik tanıda hem de patofizyolojik mekanizmaları incelemede dikkat çekmektedir. Ek olarak otonomik tepkilerin sağlıklı çocuklardan farklı olduğu, aşırı uyarılma ve otonomik disfonksiyon (parasempatik geri çekilme) ve psikososyal davranış arasında artan bir korelasyona işaret edilmektedir. Bu sebeple otizm için vagus sinirine işaret edilmektedir [9,10,11,12,13,14,15]. OSB'de yapılan çalışmalar sonucunda nöronal göç ve nöronal gelişim süreçlerinde farklılıklar bildirilmektedir. Bu sebeple beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve doublecortin (DCX) çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta ve düzensizliklerine vurgu yapılmaktadır. [16,17,18,19]. Aktif Kaspaz-3 (aktif CASP3) aktivitesinde bildirilen artış da apoptotik süreçlere işaret etmektedir [20]. Vagus sinir stimülasyonu (VNS) dirençli epilepsi ve depresyon tedavilerinde FDA onaylı kullanılan terapötik bir yöntemdir. Non-invaziv bir yöntem olan transauriküler vagus sinir stimülasyonunda (tVNS), kulağa yerleştirilen elektrotlar sayesinde vagus siniri uyarılarak parasempatik sistem aktivasyonu sağlanmaktadır [21,22]. Literatürde VNS ile OSB belirtilerinin hem davranışsal hem de biyokimyasal ve histolojik parametrelerinin iyileştirebileceği işaret edilmektedir. Biz de çalışmamızda maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde hem davranış değişikliklerini hem de nöroplastisite süreçleri üzerine olan etkilerini incelemek, ek olarak beyin morfolojisi ve apoptotik süreçleri gözlemleyerek tVNS uygulamasının bu süreçler üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu Tarihçesi

Alman psikiyatrist Eugen Bleuler, 1911 yılında şizofreniyi; “kendini gerçeklikten ayırma eğilimi” olarak tanımlamış, ağır şizofreni hastalarının gerçek hayattan koparak kendi içlerine döndüklerini belirtmiştir ve bu durumu otizm olarak tanımlamıştır [23].

Yıllar içinde otizm, aşırı hayal kurandan tam tersine hiç hayal kurmayana evrilmiştir [24]. 1943 yılında, Leo Kanner, 1938 yılından beri incelediği çoğunluğu erkek olan 11 çocukta, insanlardan aşırı uzak durma, ilişki geliştirememe, konuşmada gecikme ve tekrarlayan basit oyun aktiviteleri gözlemlemiş ve bu semptomların Eugene Bleuler'in şizofreni için tanımladığı kriterlere benzediğini belirterek bu klinik tabloyu da “İnfantil Otizm” olarak tanımlamıştır. Böylelikle Leo Kanner literatürde otizmin modern tanımını yapan ilk kişi olmuştur [25,26,27]. 1944 yılında, Hans Asperger benzer semptomları gösteren çocukları “Otistik Psikopati” olarak tanımlamıştır [26]. 1980 yılında yayınlanan Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı-III (DSM-3)’te Otizm, Yaygın Gelişimsel Bozukluklar başlığı altında, İnfantil Otizm olarak adlandırılmıştır. Otizmin ilk 30 ayda geliştiği belirtilmiştir. Ek olarak, şizofreni ile infantil otizmin ilişkisiz olduğunun daha ağırlıklı düşünüldüğü eklenmiştir [28]. 1994 yılında yayınlanan DSM-4’te ise yine Yaygın Gelişimsel Bozukluk başlığı altında ele alınan otizm bu sefer çeşitli alt başlıklarda (Asperger Bozukluk, Dezentegratif Bozukluk, Rett Sendromu, Otistik Bozukluk ve Atipik Otizm) olarak tanımlanmıştır. Otistik Bozukluk (; erken çocukluk otizmi, çocukluk otizmi veya Kanner otizmi) bebeklikte sevgi ve fiziksel temasa karşı kayıtsızlık, göz teması eksikliği, sürekli olarak karşılıklı sosyal etkileşimde bozulma, akran ilişkileri geliştirememe ve arkadaşlık kurmaya çok az ya da hiç ilgi duyulmaması gibi semptomlar belirtilmiştir [29].

Nörogelişimsel Bozukluklar başlığı altında DSM-5’te Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB); sosyal etkileşimde bozulma, sınırlı-tekrarlayan davranışlar, ilgi alanları ve aktivitelerle ve iletişim eksikleri ile tanımlanan yaygın nörogelişimsel bir bozukluktur. Bu belirtiler, gelişimin erken dönemlerinde ortaya çıkmakta ve yaşam boyu devam etmektedir. Tanı ve tedavinin daha başarılı olmasını sağlamak için Otistik Bozukluk, Asperger Bozukluğu ve Yaygın Gelişimsel Bozukluğu OSB’nin içinde topladıkları belirtilmiştir [1].

2.2. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanımı

Nörogelişimsel bir bozukluk olan OSB’de, sosyal, bilişsel ve davranışsal bozulmalar görülmekte, erken yaşlarda ortaya çıkmakta (genellikle 1-2 yaş civarında) ve yaşam boyu sürmektedir [30]. Büyük ölçüde 3 ana semptom olan sosyal etkileşimde bozulma, tekrarlayan davranışlar ve dil gelişiminde bozulma görülür. Genellikle dil ediniminde gecikme ya da dil edinilse bile iletişim kurmakta zorluk çekerler, iletişim sırasında göz teması kurma, yüz ifadesi, jestler ve vücut duruşuyla ilgili sorunlar göze çarpmaktadır [31,32]. OSB’li çocukların %30’unda, 18- 24 ay arasında beceri kayıpları ve gerileme ortaya çıkmaktadır [7]. Teşhisi genellikle 2-4 yaş civarında konmaktadır. Bu yaş dönemi yüksek sosyal, duygusal ve iletişimsel işlevlerin gelişiminin görüldüğü en önemli dönemdir [31]. Otizm Spektrum Bozukluğu olan bireylerde sıklıkla; nörodejeneratif hastalıklar, mental retardasyon, nöropsikiyatrik hastalıklar, epilepsi, artan anksiyete, hiperaktivite, dikkat eksikliği, uyku bozukluğu, gastrointestinal problemler ve davranış sorunları gibi eşlik eden semptomlar görülmektedir [2,6,30,32,33]. Otizmi tedavi etmek için henüz FDA onaylı herhangi bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır [5,34]. Bunun yanı sıra OSB’ye eşlik eden diğer semptomları azaltmaya ya da gidermeye yönelik ilaç tedavileri bulunmaktadır [5,32].

2.3. Otizm Spektrum Bozukluğu Epidemiyolojisi ve Ekonomik Sonuçları

Yıllar içinde Otizm Spektrum Bozukluğu prevalansının arttığı görülmektedir. Araştırmacılar bu durum hakkında iki temel sebep üzerine yoğunlaşmaktadır. Birincisi otizm ve şizofreninin yıllar içinde ayrışması, buna bağlı olarak DSM tanı kriterlerinin değişmesi, ikincisi OSB teşhisi için alanların genişletilmesi ya da daraltılması, öğretmenlerin, ebeveynlerin ve sağlık profesyonellerinin OSB’ye karşı artan ilgi, bilgi ve farkındalık düzeyleridir [27].

Otizm epidemiyolojisi için bilinen ilk çalışma 1966 yılında Victor Lotter tarafından yapılmıştır. İngiltere’de, 8-10 yaş aralığındaki çocuklar incelediğinde çalışmada tahmini yaygınlığın 10.000 çocukta 4,5 (yaklaşık 2222’de 1) olduğu ve erkeklerde kızlara göre daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir [35]. ABD’de 2007 yılında, 3-17 yaş arası 78037 çocuk incelenmiş ve OSB görülme sıklığı 10000’de 110 bulunmuştur. ABD’de yaşayan yaklaşık 673000 çocuğun OSB’li olduğunu tahmin edilmektedir [36]. Hastalık Kontrol Merkezine (Center for Disease Control- CDC) bağlı, Otizm ve Gelişimsel Engellileri İzleme (ADDM) Ağı, 2018 yılında; Amerika Birleşik Devlet’ine bağlı 11 eyalette yaptıkları araştırma

sonucuna göre; 8 yaşındaki çocukların yaklaşık 44'te 1'i (1000'de 23) OSB'li olarak tanımlandığını belirtmişlerdir. Ek olarak erkek çocuklarında kız çocuklarına oranla 4,2 kat daha yaygın görüldüğünü belirtmiştir [4].

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı; Aile, Çalışma ve Sosyal Hizmetler Bakanlığı; Sosyal Güvenlik Kurumu ve TÜİK ortak verilerine göre 2019 yılında toplam 38.661 OSB tanımlı birey olduğu ve bu bireylerin (0-95 üstü yaş aralığı) 31.388 erkek, 7.273 kadın bireylerden oluştuğu bildirilmiştir. Ek olarak, 0-4 yaş aralığında toplam 7580 çocuk olduğu, bunların 6.084 erkek çocuk iken 1.496 kız çocuktan oluştuğu, 5-9 yaş aralığındaki çocuklarda ise 15.324 erkek çocuk, 3.461 kız çocuk olduğu bildirilmiştir [37].

Otizm Spektrum Bozukluğunda oldukça geniş bir spektrum göstermektedir. Bazı hastalar bağımsız bir şekilde hayatlarına devam edebilirken, bazıları tam zamanlı çalışmamakta ve başkalarının gözetimine muhtaç durumda olabilmektedir [38]. Çocukluktan yetişkinliğe kadar OSB'li bireylerin her döneminde eğitim, sağlık hizmetleri ve sosyal hizmetler gibi pek çok alanda hem otizmlili bireylerin ve ebeveynlerinin hem de toplumu etkileyen, bireyden ülkelere kadar yaygın ve yüksek mali yükler getirmektedir [39, 40]. 2007 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan çalışmanın sonucuna göre; kişi başına düşen yaşam boyu toplumsal maliyet 3,2 milyon dolar olduğu düşünülmektedir [39]. 2000-2004 yılları arasında yapılan analize göre, OSB'li bireylerde kişi başına yapılan toplam harcama 5 yıllık dönemde %142,1 arttığı belirtilmiştir [41]. 2023 yılında Çin'de 2-6 yaş arası OSB tanımlı bireyler ve aileleri (n: 3236) ekonomik anket değerleri incelendiğinde yıllık toplam maliyet 34.206,5 dolar olduğu bildirilmiştir [42]. Ülkemizde ise OSB'li bireylerin tıbbi malzeme, ilaç ve sağlık hizmetlerine ilişkin yapılan toplam harcama 2017 yılında 7.502.056,69 TL, 2018 yılında 18.517.857,21 TL iken 2019 yılı Ekim ayı itibari 53.721.614,82 TL olduğu bildirilmiştir [37].

2.4. Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyolojisi

Otizm spektrum bozukluğunun etiyoloji oldukça heterojendir ve tam olarak aydınlatılamamıştır [7,8,30,43]. Spesifik bir sebebe değil hem genetik faktörler hem de çevresel etkilerin iç içe geçerek karmaşık bir etkileşimi sonucunda görüldüğü düşünülmektedir [43,44].

Erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmesi, aile çalışmalarında gözlenen yüksek kalıtsallık ve yüksek testosteron konsantrasyonu, OSB etiyolojisinin belirgin bir genetik arka

plana sahip olduğunu düşündürmektedir [8,45,46,47,48]. İkiz çalışmalarında %80-90 oranında genetik temelli olduğu belirtilmektedir [49]. Ayrıca monozigot ve dizigot ikizler için uyum oranı %10 [50] ve dizigot ikizlerde %50'den az uyum oranı bildirilmiştir [43,51]. Ailelerin ekzom sıralama çalışmalarına dayalı olarak, 350- 400 otizm yatkınlık geninin var olduğu bilinmekte ve sinaptik aktivasyon, transkripsiyon regülasyonu, nöronal migrasyon gibi alanlarda görevli olan çok sayıda gen (*FMRI1*, *MECP2*, *NLGN*, *NRXN*, *PTEN* vb.) hedef gösterilmektedir. Çoklu genetik varyantların beyin gelişimine müdahale ettiği ve OSB'ye neden olduğu düşünülmektedir [33,52,61]. Ek olarak, bağışıklık ilgili proteinleri kodlayan genler ile OSB arasında bir bağlantı olduğu ve bu durumun OSB'li bireylerde beyin gelişimini ve sinaptik işlevleri etkilediği, OSB'li çocukların önemli bir kısmında bağışıklık tepkilerinde farklılıklar gösterdiği ve göze çarpan bir immun disfonksiyon durumu, sürekli yüksek sitokin ekspresyonu belirtilmektedir [43,51].

Çevresel faktörlerin %40-50 oranında etkili olduğunu gösterilmiştir [49,53]. Hava kirliliği, anne yaşı, baba yaşı, anne sigara kullanımı, gebelikte özellikle ilk trimesterin başlarında teratojenlere maruz kalma (talidomid, valproik asit (VPA) ve etanol), annede kızamıkçık enfeksiyonu, stres, 2500 gr altı düşük doğum ağırlığı ve cıva, nikel, vinil klorür ve trikloretilen gibi çevredeki kimyasallara maruz kalma vb. çevresel nedenlerle ilişkilendirir [5,8,30,46,48,49,53,54,55,61]. Epidemiyolojik araştırmalar, özellikle gebeliğin ilk trimesterinde teratojen maruziyetinde doğan çocuklarda nörogelişimsel bozukluklar ve özellikle OSB geliştirme riskinin arttığını göstermiştir [5 16,56,57].

Otizm spektrum bozukluğunda nörobiyolojik mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemekte fakat cerebellar kortekste, serebellumda, hipokampüste, amigdalada ve prefrontal kortekste nöropatolojik anomaliler bildirilmiştir ve bu durum klinik tabloda ve patofizyolojik mekanizmalarda önemlidir [58,59,60]. Sosyal beyin alanı olarak adlandırılan amigdala, medial prefrontal korteks, fusiform girus ve oksipital ve temporal alanlar anterior singulat alan orbitofrontal alan gibi beyin bölgeleri sosyal bilgilerin işlenmesinde primer rol aldıkları için sosyal iletişim ve etkileşimde oldukça önemlidir. Sosyal algıda inferior occipital girus, superior temporeal sulcus ve girus ve çevre yapıları yüz ifadelerini okuma ve işlemede rol alırken, medial prefrontal korteks yapısı özellikle zihinselleştirmede rol almaktadır. Amigdala orbitofrontal korteks anterior singulat alan ve yine oksipital ve temporal alanlar sosyal ipuçlarını değerlendirerek karar ve davranışta rol oynar. Amigdala'nın korkulu yüz ifadelerinde hem oksipital alanlarla (görsel) hem de prefrontal korteksle (bilişsel) süreçlerde

yer almaktadır. OSB'li bireylerde ACC, mPFC gibi alanlarda aktivitede azalma olduğu raporlanmıştır [111,112].

OSB'li bireylerde subependimal tabakada kalınlaşma, serebellum ve cerebellar kortekste düzensiz kortikal yapı ve yanlış yerleşen nöron nodülleri [58,61], nöron sayısının azaldığı, hipokampüste piramidal hücre boyutunun ve CA1 ve CA4 bölgelerindeki dentritik dallanmaların azaldığı ve anterior singulat alanda subgranüler ve infragranüler katmanlardaki nöron hacimlerinin ve sayılarının azalması gibi farklılıklar bildirilmiştir [61,62,63,64]. OSB'de oldukça fazla beyin bölgesinin etkilenmesi, fetal gelişim döneminde nöronların gelişim ya da göç sürecinde oluşan anormallik nedeniyle olduğunu düşündürmektedir [58,61,65].

Beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) memeli beyinde üzerinde en çok çalışılan nörotrofinlerden biridir [66]. BDNF doğum öncesi ve doğum sonrası beyin gelişimine katkıda bulunarak nöronal sağkalımı destekler, nörotransmitter salınımını modüle eder, nöronal plastisiteye katılır, aksonal ve dendritik büyümeyi ve diğer nöroplastik süreçleri modüle etmektedir, özetle, nörogelişim sırasında hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı ve migrasyonunda önemli bir düzenleyici işlevi vardır [66,67,68,69]. Santral sinir sistemindeki aktivite ilişkili değişikliklerin özellikle hipokampus ve neokorteksteki sinaptik iletimde BDNF modifikasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [66]. Embriyogenez sırasında BDNF-TrkB sinyali ile nörogenezi düzenler [69]. Ek olarak en yüksek BDNF düzeylerinin hipokampus, amigdala ve neocorteks gibi yüksek işlevli bölgelerde olduğu bildirilmiştir [70]. Otizm spektrum bozukluğunda sinaptik disfonksiyona dikkat çekilmekte, özellikle plastisitede yer alan BDNF değişiklikleri vurgulanmaktadır [16,17]. Hücre ölümü ve nörodejenerasyona olan katkısı bilindiğinden BDNF terapilerine odaklanmak sağlıklı bir yaklaşım olabilir [18]. Hücre gövdelerinde ve aksonlarında yer alan doublecortin (DCX) nörona özgü bir fosfoproteindir [71]. Merkezi ve periferik sinir sisteminde göç eden nöroblastlardan ve genç nöronlardan DCX eksprese edilmektedir. Kortikal nöronal göç sırasında, mikrotübüllerin organizasyonunu ve stabilitesini düzenler ve nöronal göçün gerçekleştirilebilmesi için gereklidir [72]. Buna bağlı olarak, sinir sistemi gelişimi, nöron üretimi, hücre morfogenezi ve hücre farklılaşmasında görev almaktadır [19]. Nörogenez ve nöromodulasyonu yansıttığı için yaygın olarak çalışmalarda kullanılmaktadır [73]. Otizm spektrum bozukluğunda bu kadar geniş ve farklı alanlarda bildirilen nöronal anomaliler sebebiyle BDNF ve DCX OSB için biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Otizm spektrum bozukluğunda sıklıkla apoptotik süreçlerdeki farklılıklara vurgu yapılmaktadır. Apoptozdaki artış nöroanatomik anomaliliklere sebep oluyor olabilir [20]. Apoptozun yürütme sürecinde primer görev alan aktif kaspaz-3 (aktif CASP3) sistein-aspartik asit proteazdır. Aynı zamanda inflamasyon, hücre farklılaşması, dentritik budama ve proliferasyon dolayısıyla sinaptik plastisite gibi süreçlerde de görev aldığı bildirilmiştir [74,75]. Aktif CASP3 toplam hücre ölümü için bir belirteç olarak kullanılır ve OSB’de aktif CASP3 aktivitesinde artış olduğu bildirilmektedir [20,67,76,77].

2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu Valproik Asit İlişkisi ve Hayvan Deneyleri

Otizm spektrum bozukluğunun, utero mu yoksa semptomların belirginleştiği zamanda mı (yaklaşık 2 yaş) edinildiği konusunda tartışmalar devam etmekle birlikte gelişim sürecindeki değişikliklerin, tanısal semptomların ortaya çıkmasından çok önce, erken doğum öncesi yaşamda meydana geldiğine dair görüşler son yıllarda ağırlıktadır [55]. Valproik asit (N-dipropilasetik asit) veya valproat (VPA), antiepileptik bir ilaçtır ve bipolar bozukluk, migren, nöropatik ağrı [78], epilepsi [79] hastalıklarının tedavisinde duygudurum düzenleyici olarak kullanılmaktadır [46,79,80]. Plasentaya ve anne sütüne geçebilen valproik asit, hamilelik sırasında kullanılmak üzere FDA tarafından belirlenen "D" kategorisinde yer almaktadır [55]. Antiepileptik olan bu ilaç nöral tüpün kapanmasını geciktirir ve yüksek bir OSB riski oluşturur [81]. Valproik asit güçlü bir teratojendir. VPA'ya doğum öncesi maruz kalan çocukların merkezi sinir sisteminde (MSS) gelişimsel nörotoksisiteyi indüklediği bilinmektedir [5]. Klinik araştırmalar sonucunda, gebelikte valproat kullanımının bazı nörogelişimsel hastalıklarla; spina bifida aperta ve ekzensefali gibi nöral tüp defektleri, bilişsel bozukluklarla [46,49], OSB’yle [79,80] konjenital malformasyonlar ve diğer doğum kusurlarıyla, gelişimsel gecikme ve nörobilişsel yetersizlikle [5,79] ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Gebeliğin ilk üç ayında maternal VPA maruziyeti sonucunda doğum sonrasında çocuklarda fetal valproat sendromu (FVS) görülebilmektedir [46,79]. 1993 yılında Laegreid ve arkadaşları, ikisi de benzodiazepinlere maruz kalan FVS'li yedi çocuktan ikisinin otistik özellikler gösterdiğini, ikisinde de daha belirgin gelişimsel gecikmeler görüldüğünü bildirmişlerdir [57]. FVS’li çocuklarda otistik semptomların insidansının yüksek olması VPA ile otizmi ilişkilendirilmiştir [46,79]. Gebelikte kullanılan valproat sonrası doğan çocuklarda otizm ve otizm benzeri davranış değişiklikleri geliştiği bildirilmiştir [82].

Otizm Spektrum Bozukluğu çeşitli ve bilinmeyen etiyolojisiyle birlikte insanlarda yapılan araştırmalardaki kısıtlılıklar sebebiyle, hastalığın mekanizmasını aydınlatmak ve manipülasyon fırsatlarını belirlemek ek olarak farmakolojik tedavilerin potansiyel etkilerini incelemek için geçerli ve güvenilir iyi karakterize edilmiş hayvan modellerine ihtiyaç duyulmaktadır [34].

Kemirgenler, temelinde anormal sosyal davranışların görüldüğü nörogelişimsel bozuklukları modellemek için uygundur. Çünkü, yavruları için ebeveynlik ve yuva ortamı oluşturma ve yetişkinlik dönemlerinde kur yapma ve agresif davranışlar sergileme gibi çok çeşitli sosyal davranışlar sergilerler [47]. Tıpkı diğer kemirgenlerde olduğu gibi fareler de hiyerarşiler oluşturur, oyun oynar, çiftleşir ve yavrularını yetiştirirler. OSB'lerin temel özellikleri olan, sosyal etkileşimdeki bozulma, anksiyete, dikkat eksikliği, tekrarlayan ve basmakalıp motor davranışlar farelerde modellenenebilir [83].

Maternal VPA maruziyeti, hem sıçanlarda hem de farelerde, insanlardaki OSB'deki gibi otistik davranışlar benzer semptomlara neden olduğu bilinmekte ve yaygın olarak OSB çalışmaları için kullanılmaktadır [5,46,55,79,81]. Gebe annelerin VPA kullanımının tam olarak ne zaman bebeğe etki ettiğini cevaplamak oldukça zordur. Çünkü bu ilacı kullanan anneler tüm gebelikleri boyunca kullanmaya devam etmektedir fakat doğan çocukların somatik özellikleri incelenerek teratojenik etki zamanı tespit edilmeye çalışılmıştır ve nöral tüpün kapanmasına işaret edilmiştir [55,84]. VPA ile indüklenen kemirgen modellerini kullanan prelinik araştırmalar, VPA dozunu, maruz kalma sıklığını, doz-yanıt zaman penceresini ve cinsiyet farklılıklarını araştırmış ve tanımlamıştır [85]. Gebe kemirgenlerde nöral tüpün kapanması sırasında tek doz VPA uygulanarak OSB modellenenebilmektedir [54,55,56].

2.6. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu

Onuncu kranial sinir olan nervus vagus (CN X), somatomotor, parasempatik ve sensitif liflerden oluşur ve en uzun kafa çifti olup boyun, toraks ve karın içinde seyreder [86]. %20'si efferent liflerden ve %80'i afferent liflerden oluşmaktadır [87]. Nöronlarının somaları medulla oblongata'nın üç çekirdeğinde (nucleus dorsalis nervi vagii, nucleus tractus solitarius alt bölümü (NTS) ve nucleus ambiguus orta bölümü) yer almaktadır [86]. N. vagusun r. auriculares dalı (aVN), dış kulakta cyma conchae ve cavum conchaenin innervasyonunu sağlar [88,89].

CN X afferent iletileri, beyin sapında bulunan NTS'ye iletilmektedir [87]. Nucleus tractus solitarius'da sinaps yapan nöronlar, otonomik fonksiyonu düzenlemek için otonom reflekslere katılırlar. Ek olarak, NTS'den çıkan afferent iletiler, nuc. paraventricularis, amigdala, nuc. raphe dorsalis, nuc. parabrachialis, locus coeruleus, serebellum, talamus ve orbitofrontal korteks ayrıca limbik ve paralimbik yapılar dahil olmak üzere beyin çok sayıda çeşitli bölgelerine aktarılır [13,21,87,90]. Efferent iletileri ise, parasempatik nuc. dorsalis nervi vagii'den (NDNV) ve motor iletiler nuc. ambiguus'dan çıkar [13,86,91]. Hem NTS hem de NDNV, parasempatik sinir sisteminin merkezi olan dorsal vagal kompleksi oluşturur ve NV'nin afferent ve efferent aktivasyonları sırasında birbirlerini etkiler [13].

Otonom sinir sistemi (OSS), duygudurumu düzenleme ve sosyal davranışlar üzerinde etkilidir. CN X, periferden gelen interseptif sinyalleri otonomik ağa bağlar [12]. Visseral durum, ruh hali ve duygulanımın düzenlenmesinden sorumlu beyin yapılarını içeren büyük bir entegre geribildirim sisteminin önemli bir parçasıdır [62]. Nöro-endokrin-bağışıklık ekseninde homeostazinin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır [87]. Afferent liflerinin uyarılmasıyla epilepsi, depresyon ve hatta otizmle ilişkili tekrarlayan kendine zarar verme davranışlarıyla ilgili beyin yapılarını düzenlediğini gösteren çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır [62]. Otizm ve depresyon gibi hastalıklarda CN X'in işlev bozukluğu gösterdiği ve bu durumun sosyal etkileşim sırasında duyguların değerlendirilmesinde bozulmalara sebep olduğu düşünülmektedir, fakat hala bu bir teori olarak kalmıştır, kanıtlanması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [92].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, OSB'de görülen yüz ifadelerinde değişikliklere, iletişim bozukluklarına, uyku bozukluklarına ve tekrarlayıcı davranışlara parasempatik sistem disfonksiyonun sebep olabileceğini göstermektedir. OSB'li bireylerde, aşırı uyarılma,

değişmiş hipotalamik hipofiz adrenal eksen, vagal tonus düşüklüğü, otonomik disfonksiyon (parasempatik geri çekilme, hipersempatik duruma eğilim) ve psikososyal davranış arasında artan bir korelasyona işaret edilmektedir. Bu sebeple CN X, OSB’de hedef gösterilmektedir [9,10,11,12,13,14,15,102].

1997 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, ilaca dirençli epilepsi hastalarında, nöbetlerin sıklığını ve süresini azaltmaya yardımcı olmak için 12 yaşından büyük hastalarda ilaçlara alternatif bir tedavi olarak vagal sinir stimülasyonunu (VNS) onaylandı [93,94]. 2005 yılında, duygudurum üzerinde etkinliği fark edilince kapsamı genişletildi ve 18 yaş ve üzeri hastalarda, tedaviye dirençli şiddetli, tekrarlayan unipolar ve bipolar depresyon tedavisi için FDA tarafından onaylandı [12]. Migren [96] inme [97] ve çeşitli hastalıklarda da etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. VNS’nin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da anti inflamatuvar etkisi olduğu belirtilmekte [99]. VNS, beyin yapılarında (hipokampus, bazolateral amigdala, PFC) norepinefrin artırır, böylece hayvanlarda ve insanlarda hafıza oluşumunu, duygusal olarak uyandıran anıların konsolidasyonu ve korku tükenmesini iyileştirmek için kullanılabilir [93,101,102], ek olarak, tersine öğrenmeyi geliştirdiği belirtilmektedir [103]. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve immün modülasyon etkilerini artırarak nöroplastisitede rolü olabileceği düşünülmekte [12], epilepsi ve depresyon gibi OSB’ye eşlik eden bozukluklar için tedavi etkileri üretebileceğini belirtilmektedir [94,100].

VNS’nin invaziv ve non-invaziv yöntemleri vardır [89]. İnvaziv yöntemde, servikal bölgede yer alan carotis paketinin içinde seyreden CN X’ye cerrahi olarak elektrotların implantasyonu yapılmaktadır. Bu uygulamada cerrahi komplikasyon riskleri, iyileşme sürecinin dezavantajları ya da stimülasyon sırasında öksürme, hırıltı ve yüksek maliyetler gibi olumsuz etkilerin görülebilmektedir [22,87,95].

Non-invaziv yöntemde iki yol bulunmaktadır. Kulaktan (transkutanöz auricular) ya da servikal bölgeye (transkutanöz servikal) yine deri üzerinden yerleştirilen elektrotlar yardımı ile yapılmaktadır [22,87]. Fakat servikal yerleşimli uyarımda anatomik olarak NV’nin carotis kılıfı içerisindeki seyri ve m. sternoklaidomastoideum’un altından seyri dolayısıyla uyarımın etkinliği ve bu bölgedeki liflerin hem afferent hem de efferent liflerden oluşması, stimülasyon sonucu oluşacak etkiyi değiştirebilir [22].

Transauricular vagal sinir stimölasyonunda (tVNS) hedef, CN X'in auricular dalıdır (aVN), bu sebeple kulak kepçesindeki cymba conchae ve cavitas conchae bölümleri innervasyonu amaçlanmaktadır [22,92]. tVNS, CN X'in afferent liflerini uyarır. TVNS cihazı 2010 yılında CE onayı almıştır [95]. tVNS'nin en sık görülen yan etkileri, elektrotların yerleştirilmesine bağılı lokal cilt tahrişleri, baş ağrısı ve nazofarenjitir [104]. Hem tVNS hem de VNS ile NTS'ye projeksiyonlar yoluyla nöromodölasyon sağılanarak aynı beyin bölgelerini uyardığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır [12,21,89,95]. Fonksiyonel manyetik rezonans görüntülemeye, sağılıklı insanlarda tVNS'nin, beyin sapı bölgesinde (locus coeruleus ve NTS) aktivasyonu arttırdığı; böylece tVNS'yle CN X'in beyin sapındaki vagal afferentlerinin etkili bir şekilde uyarabildiğı belirtilmektedir. 38 sağılıklı gönüllüden oluşan bir çalışmada aktif tVNS, sahte stimölasyonla karşılaştırıldığında, CN X'in kolay öğeler için gelişmiş duygu tanıma, belirgin sosyal ipuçlarını çözme yeteneğini desteklediğı, duygu tanımaya nedensel olarak dahil olduğu bildirilmiştir. VNS'nin sosyal bilişteki olumlu etkilerini gösteren çalışmalar aslında VNS'nin otizmde görülen sosyal değışiklikleri olumlu yönde etkileyebileceğini gösterebilir [92].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın davranış deneyleri Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinde, histolojik boyama ve analizler Gazi Üniversitesi Nöropsikiyatri Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezinde, western blotting analizleri ise Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezinde (NÖROM) yapıldı. Deneylerde C57BL/6 tür yavru fareler kullanıldı. Merkezde üretilen, 20-30 gram ağırlığında C57BL/6 dişi fareler ve erkek farelerle çiftleştirildi ve gebelik 12,5. günlerinde gruplarına uygun olarak musluk suyu (oral) ya da VPA (600 mg/kg- oral) verildi [105]. Doğan toplam 24 erkek C57BL/6 yavru erkek fare deneylerde kullanıldı.

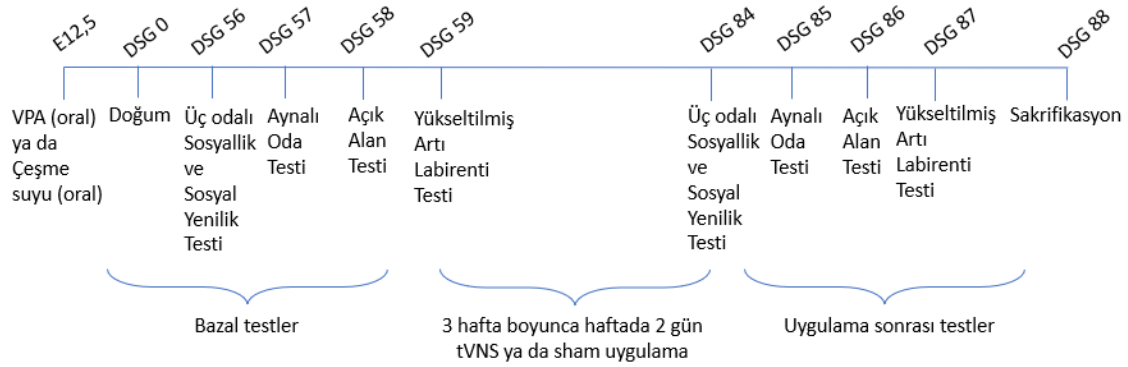
3.1. Deney Grupları

Doğan yavrular 28 güne kadar anneleriyle birlikte aynı kafeste bırakıldı. 29. günde, 1 kafese 4 yavru olacak şekilde annelerinden cinsiyetlerine göre ayrıldı. Deneklerin hepsi havalandırma ve ısıtma sistemleri otomatik olarak ayarlanan standart laboratuvar koşullarında (21 ± 1 °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) barındırıldı. Farelerin beslenmesinde standart fare yemi ve musluk suyu kullanıldı, ad libitum yemeğe ve suya erişimleri vardı.

Kontrol+sham grup: 8 sağlıklı erkek fare; Gebelik 12,5. gününde oral taşıyıcı uygulanan annelerin yavruları kullanıldı. Doğum sonrası 56. Günde (DSG) her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca bazal davranış deneyleri yapıldı. 9., 10. ve 11. haftalarında (3 hafta boyunca) haftada 2 kez anestezi altında (ketamin, i.m.) sham uygulama yapıldı. DSG 84'te yine her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca uygulama sonrası testleri yapılarak DSG 88. günde sakrifikasyonları gerçekleştirildi (Resim 3.1). tVNS uygulaması, 3.3. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu Uygulaması başlığında detaylıca anlatılmıştır.

Otistik+sham Grup: 8 otistik erkek fare; Gebelik 12,5. gününde oral VPA uygulanan annelerin yavruları kullanıldı. Doğum sonrası 56. günde (DSG) her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca bazal davranış deneyleri yapıldı. 9., 10. ve 11. haftalarında (3 hafta boyunca) haftada 2 kez anestezi altında (ketamin, i.m.) sham uygulama yapıldı. DSG 84'te yine her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca uygulama sonrası testleri yapılarak DSG 88. günde sakrifikasyonları gerçekleştirildi (Resim 3.1). Sham uygulama, 3.3. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu Uygulaması başlığında detaylıca anlatılmıştır.

Otistik+tVNS Grubu: 8 otistik erkek fare; Gebelik 12,5. gününde oral VPA uygulanan annelerin yavruları kullanıldı. Doğum sonrası 56. günde her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca bazal davranış deneyleri yapıldı. 9., 10. ve 11. haftalarında (3 hafta boyunca) haftada 2 kez anestezi altında (ketamin, i.m.) tVNS uygulaması yapıldı. DSG 84'te yine her gün 1 davranış deneyi olacak şekilde 4 gün boyunca uygulama sonrası testleri yapılarak DSG 88. günde sakrifikasyonları gerçekleştirildi (Resim 3.1). Sham uygulama, 3.3. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu Uygulaması başlığında detaylıca anlatılmıştır.



E12,5: embriyonik 12,5. gün, **DSG:** doğum sonrası gün, **VPA:** valproik asit, **tVNS:** transauriküler vagus sinir stimülasyonu

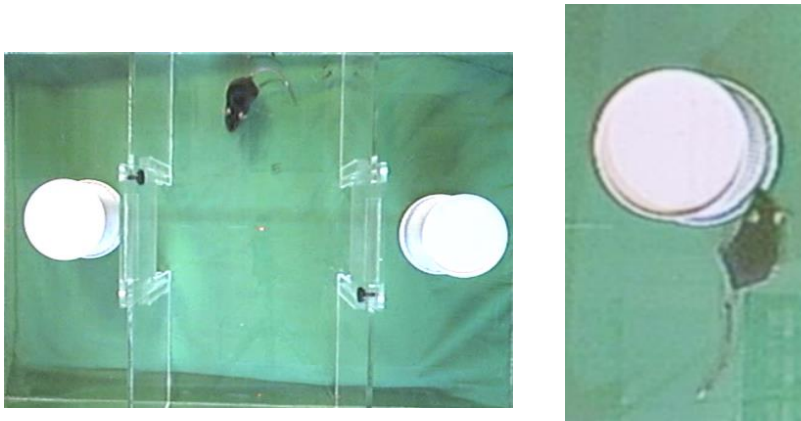
Resim 3.1. Çalışmanın akış şeması

3.2. Davranış Deneyleri

Davranış deneylerine başlamadan 30 dk önce fareler deney salonuna getirilerek alışmaları sağlandı. Her deney bitiminde %70 etanolle düzenekler silinip temizlendi ve 5 dk kuruması beklendi. Bazal davranış deneyleri 56-59 günleri arasında, sham ya da tVNS uygulaması sonrası deneyler 84-87 günleri arasında yapıldı. 88. günde sakrifiye edildi (Resim 3.1).

3.2.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi

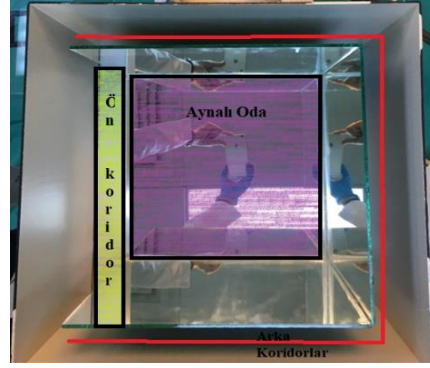
Şeffaf pleksiglastan yapılmış olan düzenekte 3 oda bulunmakta ve arada bulunan açık kapılar odalar arası geçişe izin vermektedir (60 cm x 40cm x 20cm). 1 farenin deney süresi toplam 25 dk'dır. İlk 5 dk denek farenin ortama alışması için tüm kapılar açık şekilde serbest gezip alışma oturumudur. 1. Oturumda sosyal tanıma oturumudur. Bu oturum 10 dk sürmektedir. Sol odada bulunan tel kafesin içerisine aynı yaş ve cinsiyette türdeş fare konulur ve denek fare orta odaya alınır kapılar yeniden açılır ve kayıt başlatılarak odadan çıkılır. 2. Oturum ise sosyal yenilik oturumudur. Sağ odada bulunan tel kafesin içerisine yeni bir türdeş fare konularak ilk 10 dk olan sosyal tanıma oturumdaki fare yerine yeni fareyi tercih etme durumu değerlendirilir. Ek olarak sosyallik oturumu için sosyal indeks (SI) dolu kafes süresinin boş kafes süresine oranı, sosyal yenilik oturumu için sosyal yenilik indeksi (SYİ) yabancı fare odasında kalma süresinin tanıdık fare odasında kalma süresine oranı olarak incelenmektedir [85].



Resim 3.2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi düzenneği

3.2.2. Aynalı oda testi

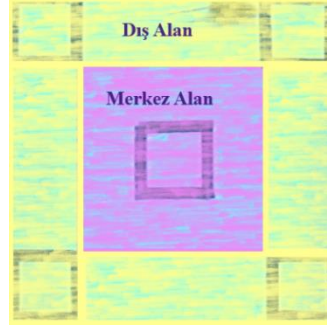
Aynalı oda testi, bir adet opak pleksiglastan yapılmış tavanı olmayan bir küp ve içine yerleştirilen, iki tarafı açık aynalı bir küpten oluşmaktadır. Aynalı küp, 4 adet aynalı yüzeyden yapılmıştır (3 adet yan yüz, 1 adet taban). Deney 10 dk süreyle yapıldı. Davranış deneyi parametreleri; aynalı odanın önündeki koridorda kalma süresi, aynalı odaya ilk giriş zamanı, aynalı odada geçirdiği süre ve aynayla temas haline olduğu süre hesaplanmıştır. Merkez ayna oranı hesaplamasında ışık alan alanlarda kalma süreleri toplam süreye bölünerek bir oran elde edilmektedir. Bu sayede hem sosyallik hem de sosyal anksiyete konularında görüş elde edilebilmektedir [106].



Resim 3.3. Aynalı oda testi düzeneği ve analizi

3.2.3. Açık alan testi

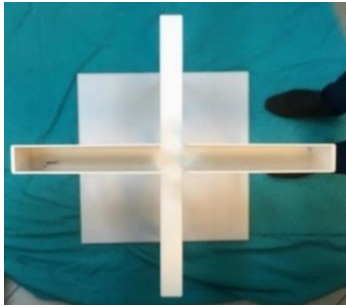
Şeffaf pleksiglastan, 40 cm x 40 cm x 30 cm ölçülerinde, tabanı ve 4 duvarı bulunan üstü açık bir kutudur. Tabandaki köşeler ile merkez alana kare şekli çizilerek işaretlendi. Deney 10 dk uygulandı ve deney sonrasında farelerin (4 ayağı da içeride olacak şekilde), merkez alanlarda kalma süreleri ile dış karelerde kalan bölgede geçirdiği süre hesaplandı [107].



Resim 3.4. Açık alan testi düzeneği ve analizi

3.2.4. Yükseltilmiş artı labirenti testi

Yerden 50 cm yüksekte 2 açık 2 kapalı koldan oluşan artı şeklinde beyaz pleksiglastan yapılmış bir düzenek kullanıldı. Deney 5 dk uygulandı ve deneyde açık kollarda, merkez alanda ve kapalı kollarda kalma süreleri belirlenerek yüzdeleri alınıp analizleri yapıldı [108].



Resim 3.5. Yükseltilmiş artı labirenti testi düzeneği ve analizi

3.3. Transauriküler Vagus Sinir Stimülasyonu Uygulaması

Tüm gruplardaki hayvanlara haftanın 2 günü ketamin (IM) anestezi uygulandı. Stimülasyon verilecek olan otistik+tVNS grubuna ketamin+tVNS uygulaması yapıldı. Uyuyan fareler kartona tespitlendi, stimülatörün elektrotlarına jel sürülerek farelerin her iki kulağının konkasına gelecek şekilde elektrotlar yerleştirildi ve stimülasyon cihazı açıldı. 30 dk boyunca (30 sn ON- 30 sn OFF modu, 5 V, 1 mA, 10 Hz) atımlı darbe stimülatörüyle (Vagustim, Türkiye) uyarım sağlandı. Sham uygulamada ise; kontrol+sham ve otistik+sham grubuna uygulandı. Uygulama öncesinde ketamin (IM) anesteziye alınan gruplardaki hayvanlara elektrotlar yerleştirildi fakat uyarım verilmedi. Sham ya da tVNS sonrası farelerin anesteziye çıkma durumları gözlemlendi, uyandıktan sonra kafeslerine geri alındı (Resim 3.6).



Resim 3.6. Transauriküler vagus sinir stimülasyon cihazı ve uygulaması

3.4. Histolojik İncelemeler

Sakrifikasyondan 1 gece önce %4'lük paraformaldehit solüsyonu hazırlandı. Bunun için 1 l distile suyun içerisinde 10 tablet fosfat tamponlu salin (PBS) ve 40 gr paraformaldehit (PFA) tozu eklenerek 80°C'de, 3 dönüş hızında vortekste, yaklaşık 5 saat süreyle çözünmeye bırakıldı. Karışım şeffaf hale geldiğinde +4 °C'ye kaldırıldı. Sakrifikasyon sabahı PFA'nın pH'ı ölçülerek 7,4'e ayarlandı.

Ketamin+ksilazin anestezi ile derin anesteziye alınan yavruların kardiyak kanları alınarak sakrifikasyonları gerçekleştirildi. Çıkarılan beyin dokusu, bir yarısı immünohistokimya, diğer yarısı da Western Blotting analizlerinde kullanılmak üzere bisturi ile ikiye bölündü.

İmmünohistokimyasal analiz için ayrılan beyin dokusu +4 °C’de, %4’lük PFA solüsyonu içerisinde fikse edildi. Diğer yarısı Western Blotting analizinin yapılacağı ana kadar -80 °C’de saklandı. Histolojik değerlendirmeler için her bir farenin bir hemisferi %4 tamponlu PFA solüsyonunda fikse edildi. Fikse olan örnekler akarsu altında yıkama işlemini takiben artan derecelerde alkol serilerinden (%50, %65, %75, %85 ve %96) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilende şeffaflandırılarak sıvı parafinde infiltrasyonu takiben dokular parafin bloklar haline getirildi. Her bir parafin beyin bloğundan, Allen Mouse Brain Atlas referans alınarak prefrontal korteks, amigdala ve hipokampus bölgelerini içeren 5µm kalınlığında ardışık kesitler rotary mikrotom (Leica RM2245, Almanya) ile kesilerek pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı [109]. Alınan kesitler bir gece oda sıcaklığında kuruduktan sonra ertesi gün 59 °C’lik etüvde bir gece boyunca bekletildi. Parafin kesitler 2 ksilen serisinden 15’er dakika geçirilerek deparafinize edildi. %100, %96, %75 etil alkol serilerinde 10’ar dakika bekletilen ve en son aşamada PBS içerisine alınan kesitlerin redihidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Rehidratasyonu takiben ardışık kesitler histolojik değişiklikleri değerlendirmek için krezil viyole ile boyanırken immünohistokimyasal incelemeler için de BDNF ve DCX antikorlarıyla işaretlendi. Krezil viyole boyalı preparasyonların değerlendirilmesi sırasında dikkati çeken “koyu nöron” görünümündeki nöronların apoptotik olup olmadığını doğrulamak için krezil viyole boyalı prefrontal korteks kesitlerinin ardışık kesitleri ayrıca aktif kaspaz-3 (aktif CASP-3) antikoru ile de işaretlendi.

3.4.1. Kesitlerin krezil viyole ile boyanması ve boyalı kesitlerin incelenmesi

Kesitler krezil viyole boyama solüsyonu (1:10 dilüsyonda, ABCAM, ab246817, İngiltere) ile üretici firmanın prosedürüne uygun olarak boyandı. Bunun için, rehidratasyonu takiben doku kesitleri 5 dk süreyle 1:10 dilüsyonda krezil viyole asetat solüsyonu ile inkübe edildi. Distile su ile yıkamanın ardından %100 alkole daldırılarak dehidrate edilen kesitler ksilen içerisine alındı ve ardından entellan ile kapatıldı. Krezil viyole ile boyanmış kesitler bilgisayar destekli ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Almanya) 100× ve 400× büyötmelerde incelendi ve Leica LAS V4.12 programı kullanılarak kesitlerin görüntüleri alındı. İnceleme için insandaki prefrontal korteksin hayvanlarda karşılığı olan infralimbik alan, prelimbik alan ve anterior singulat alan, ek olarak, amigdalanın alt çekirdekleri olan lateral amigdala, bazal amigdala, medial amigdala ve santral amigdala bölgeleri Allen Mouse Brain Atlas referans alınarak belirlendi [109]. Bu alanların nöronal yoğunluğunu gruplar arası karşılaştırmak üzere 400× büyöltmede görüntüleri alındı. Elde edilen

mikrograflarda ImageJ programı kullanılarak ilgili bölgelerin alanları ölçüldü ve nöronlar sayıldı (ImageJ 1.54d, Ulusal Sağlık Enstitüleri, Birleşik Devletler) [110]. Daha sonra nöron sayısı alana oranlanarak hücre yoğunluğu “nöron sayısı/ μm^2 ” şeklinde ifade edildi. Ayrıca hipokampus cornu ammonis 1 (CA1) ve CA3 bölgelerinde piramidal hücre yoğunluğunu değerlendirmek üzere, CA1 ve CA3 bölgeleri $400\times$ büyültmede gözlemlenerek ardışık mikrograflar elde edilmek suretiyle görüntüldü. Elde edilen her bir mikrografta piramidal hücre tabakası alanı ölçüldü ve veziküler görünümde nükleuslarıyla karakterize intakt piramidal nöronlar sayıldı. CA1 ve CA3 bölgelerine ait ortalama piramidal nöron yoğunluğu “piramidal nöron sayısı/ μm^2 ” olarak ifade edildi. Aynı kesitlerde ayrıca dentat girus (DG) da tüm uzunluğu boyunca ardışık mikrograflar elde etmek suretiyle $400\times$ büyültmede görüntüldü. Ardından, her bir mikrografta DG granüler hücre tabakası kalınlığı farklı bölgelerden ölçülerek ortalama bir granüler hücre tabakası kalınlığı elde edildi. Tüm analizler için ImageJ programı kullanıldı (ImageJ 1.54d, Ulusal Sağlık Enstitüleri, Birleşik Devletler) [110].

3.4.2. Kesitlerin immün boyama prosedürü ve boyalı kesitlerin incelenmesi

Rehidratasyonu takiben parafin kesitler, sitrat tamponu (pH 6.0) içerisine alınarak mikrodalga fırında yüksek ısıda antijen dönüştürme işlemi uygulandı. Sonrasında oda ısısında soğumaya bırakılan kesitlerin etrafı hidrofobik kalem olan pap-pen ile sınırlandırılarak kesitler %0,1 Tween 20 içeren PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra doku endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek üzere, kesitler oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika süreyle %3'lük H_2O_2 ile inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dk. %0,1 PBS-Tween 20 ile yıkanan dokuların üzerine spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için protein bloklama solüsyonu UltraV block (TA-125-UB, Thermo Scientific, Birleşik Devletler) damlatılarak 30 dk. oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan, kesitler anti-BDNF (1:200 dilüsyonda, Bioss, bs-4989R, Birleşik Devletler), anti-DCX (1:200 dilüsyonda, Bioss, bs-3113R, Birleşik Devletler) ve anti-cleaved caspase-3 (1:1000 dilüsyonda, Affinity Biosciences, AF7022-BP, Birleşik Devletler) primer poliklonal antikolarıyla gece boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontroller için antikor solüsyonu yerine doku üzerine PBS damlatıldı. Primer antikorlarla inkübasyonun ardından doku kesitleri 3 kez 5'er dk. %0,1 PBS-Tween 20 ile yıkandı. Ardından oda ısısında biyotinli sekonder antikor (TP-125-BN, Thermo Scientific, Birleşik Devletler) ile 20 dk. inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonunda 3

kez 5'er dk. %0,1 PBS- Tween 20 ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından kesitler oda ısısında 20 dk. süreyle streptavidin-peroksidaz enzim kompleksi (TS-125-HR, Thermo Scientific, Birleşik Devletler) ile inkübe edildi. Üç kez 5 dk. %0,1 PBS- Tween 20 ile yıkamanın ardından kesitler, diaminobenzedin (DAB) kromojen-substrat kompleksi (TA-125-HDX, Thermo Scientific, Birleşik Devletler) ile 5 dk. inkübe edilerek gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Daha sonra kesitler 3 kez 5'er dk. %0,1 PBS-Tween 20 ile yıkandı. Mayer'in hematoksilini ile 1 dk. karşıt boyama yapıldıktan sonra, kesitler akan musluk suyu altında yıkandı. Sırası ile %75, %96 ve %100 dereceli alkollerde 5'er dk. tutulduktan sonra 15 dk. ksilende bekletildi ve entellan ile kapatma yapıldı.

Hazırlanan preparatlar bilgisayar destekli ışık mikroskobunda (Leica DM 4000B, Almanya) değerlendirildi ve Leica LAS V4.12 programı kullanılarak görüntüleri alındı. Alınan görüntülerde ImageJ programı kullanılarak mikrograflardan ayrı ayrı hematoksilin ve DAB görüntüleri elde edildi. Hematoksilin boyalı görüntülerde nöronların nükleusları sayılarak alandaki toplam nöron sayısı belirlendi. Ardından DAB boyalı görüntülerde alandaki pozitif boyanan nöron sayısı belirlendi. Daha sonra alandaki pozitif boyanan nöron sayısı tüm nöron sayısına oranlanarak immünpozitif boyanma yoğunluğu "% pozitif hücre" olarak belirtildi.

3.5. Western Blotting Analizi

Farelerin -80 C'de saklanan yarım hemisferleri anti BDNF ve anti-DCX parametrelerinin protein düzeyleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) western blot yöntemi ile belirlendi. Protein düzeyleri, Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezin'de (NÖROM) bulunan Western Blot Sistemi tarafından analiz edildi. Her grubu temsil edecek şekilde tartılan doku örnekleri 1,5 ml'lik tüpler içerisinde cam ve metal homojenizatörler ile homojenize edildi, dokudan izolasyon yapabilen T-PER solüsyonu ile izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra kantitasyon için florometrik tabanlı cihaz (Qubit 4 Fluorometer, Thermofisher Scientific) ile izole edilen örneklerin ölçümü yapıldı. Ölçüm işlemleri bittikten sonra örnekler 4x konantrasyonda lityum dodesil sülfat içeren buffer (LDS sample buffer), 10x konsantrasyonda 500 mM dithiothreitol (DTT) içeren buffer ve su ile yüklenecek olan hacim hesaplanarak örnekler hazırlandı. Daha sonra kuru blok ısıtıcıda 10 dk bekletilerek örneklerdeki proteinlerin lineerize olması sağlanacaktır. Yükleme hazır olan örnekler, dikey elektroforeze yerleştirilen %4-12 bis-tris yapıları hesaplanan hacim kadar yüklendi. Jelin bir kuyusuna kolorimetrik (SeeBlue™ Plus2 Önceden Boyalı Protein Standardı, Invitrogen) ve

kemilüminesan (MagicMark™ XP Western Protein Standardı, Invitrogen) olan protein işaretleyicisi de aynı anda yüklendi. Güç kaynağı (PowerEase Touch 120W Güç Kaynağı, Thermofisher Scientific) 200 V ve 22 dakikaya ayarlanıp elektroforez başlatıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam levhalardan ayrıldı ve dört aşamadan oluşan Western blot işlemine geçildi. Jeldeki proteinlerin nitroسلؤلوز membrana aktarımı (blotlama), (The Power Blotter XL, Thermofisher Scientific), ikincisi; spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroسلؤلوز membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), üçüncüsü; özgül primer antikorlar BDNF (Invitrogen, MA5-41112), DCX (Invitrogen, MA5-33102) ve beta Aktin Antikoru, Invitrogen (MA5-33078) bunlara uygun sekonder antikorlar (iBind™ Flex Western Device, Invitrogen) ile deteksiyon ve son aşamada ise; proteinlerin görüntülenme aşamasıdır (iBright™ FL1500 Görüntüleme Sistemi, Invitrogen). Bu işlemler ile proteinler nitroسلؤلوز membrana yarı-kuru blotlama ile aktarılacak daha sonra otomatik deteksiyon cihazı ile primer ve sekonder antikor uygulamaları yapıldı. Deteksiyon sonrası membran kemilüminesan substrata maruz bırakılıp görüntüleme işlemi yapıldı. Görüntüleme sonrası bant yoğunlukları analiz edilerek analiz işlemleri tamamlandı.

3.6. İstatistiksel analiz

Araştırma verileri “SPSS 25.0 (Statistical Package for Social Sciences)” bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. Analizlerde non-parametrik ve üç gruba ilişkin ölçümler karşılaştırmak ve gruplar arasında farklılıkların analizi için Kruskal Wallis analiz yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde anlamlı çıkan farklar için ikili grup kıyaslamaları post hoc Dunn’s Bonferroni testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Valproik Asidin Otizm Spektrum Bozukluğu modeli oluşturmadaki etkisi bazal testlerde değerlendirildi. tVNS ya da sham etkisi uygulama sonrası testlerde kıyaslandı. Tüm uygulanan davranış deneylerinin analizleri başlıklar halinde aşağıda belirtildi.

4.1. Davranış Deneyi Bulguları

4.1.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi bulguları

Farelerin bazal üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik davranış deneyi 56. günde sham ya da tVNS uygulaması sonrası 84. günde davranış deneyi yapıldı.

Çizelge 4.1: Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyallik oturumu odada kalma süreleri

		Kontrol+sham (Ort.±SH)	Otistik+sham (Ort.±SH)	Otistik+tVNS (Ort.±SH)	p
Bazal	Dolu odada kalma süresi	362,4±17,6	260,4±40,9	240,3±31,1	0,013
	Orta odada kalma süresi	96,8±13,5	120,9±22,3	153,8±25,1	0,299
	Boş odada kalma süresi	140,8±8,45	218,7±43,8	206±43,3	0,045
Uygulama sonrası	Dolu odada kalma süresi	266,9±9,3	191,4±10,9	260,8±9,7	0,042
	Orta odada kalma süresi	127,9±14,8	136,7±17,3	123,5±8,8	0,746
	Boş odada kalma süresi	217,8±7,3	265,6±18,7	215,6±11,5	0,033

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmiştir. **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Bazal sosyallik oturumu incelendiğinde; kontrol+sham grubunun dolu odada hem otistik+sham hem de otistik+tVNS gruplarından daha uzun süre kaldığı belirlendi (sırasıyla, $p<0,05$ ve $p<0,01$). Orta odada kalma sürelerinde 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). Hem otistik+sham hem de otistik+ tVNS grupları, kontrol+sham grubuna göre daha fazla boş odada kaldığı belirlendi ($p<0,05$). Otistik gruplar arasında hem dolu odada kalma hem de boş odada kalma süreleri arasında anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Sham ya da tVNS uygulaması sonrası sosyallik oturumu incelendiğinde, hem kontrol+sham hem de otistik+tVNS grupları otistik+sham grubuna göre daha az dolu odada kaldığı saptandı ($p<0,05$). Orta odada kalma süreleri 3 grup arasında anlamlı farklı değildi ($p>0,05$). Otistik+sham grubunun hem kontrol+sham hem de otistik+tVNS gruplarından daha fazla süre boş odada kaldığı görüldü ($p<0,05$). Kontrol+sham grubu ile otistik+tVNS grubu arasında hem dolu odada hem de boş odada kalma süresinde anlamlı fark yoktu ($p>0,05$), (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyal yenilik oturumu odada kalma süreleri

		Kontrol+sham (Ort.±SH)	Otistik+sham (Ort.±SH)	Otistik+tVNS (Ort.±SH)	p
Bazal	Tanıdık fare odasında kalma süresi	234,1±11,9	269,4±9,9	263,5±11,4	0,121
	Orta odada kalma süresi	89,44±8,9	152,9±22,7	132,5±16,04	0,084
	Yabancı fare odasında kalma süresi	276,4±10,9	177,7±15,1	204±12,9	0,001
Uygulama sonrası	Tanıdık fare odasında kalma süresi	187,5±11,6	301,3±20,9	228,6±11,2	0,002
	Orta odada kalma süresi	167,9±4,5	97,1±10,2	137,6±8,4	0,001
	Yabancı fare odasında kalma süresi	244,6±12,7	201,6±14,6	237,1±10,6	0,014

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmiştir.

Ort.: Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Bazal sosyal yenilik oturumu incelendiğinde; bazal testlerde 3 grup arasında hem tanıdık farenin olduğu odada hem de boş odada kalma sürelerinde anlamlı fark yoktu (sırasıyla, $p:0,121$ ve $p:0,084$). Yabancı farenin olduğu odada ise kontrol+sham grubunun hem otistik+sham hem de otistik+ tVNS gruplarından daha fazla süre odada kaldığı belirlendi (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Otistik gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1).

Sham ya da tVNS uygulama sonrası sosyal yenilik oturumu incelendiğinde; otistik+sham grubu tanıdık farenin olduğu odada, kontrol+sham ve otistik+tVNS grubuna göre daha fazla süre kaldı (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Hem kontrol+sham hem de otistik+tVNS grubunun otistik+sham grubuna göre orta odada daha fazla süre kaldığı görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Yabancı farenin olduğu odada ise kontrol+sham ve otistik+tVNS grubunun

otistik+sham gruba göre daha fazla süre kaldığı görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Kontrol+sham ve otistik+sham grubu arasında tanıdık farenin olduğu odada, boş odada ve yabancı farenin olduğu odada kalma süresinde anlamlı fark yoktu ($p>0,05$), (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.3. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sosyallik ve sosyal yenilik indeks sonuçları

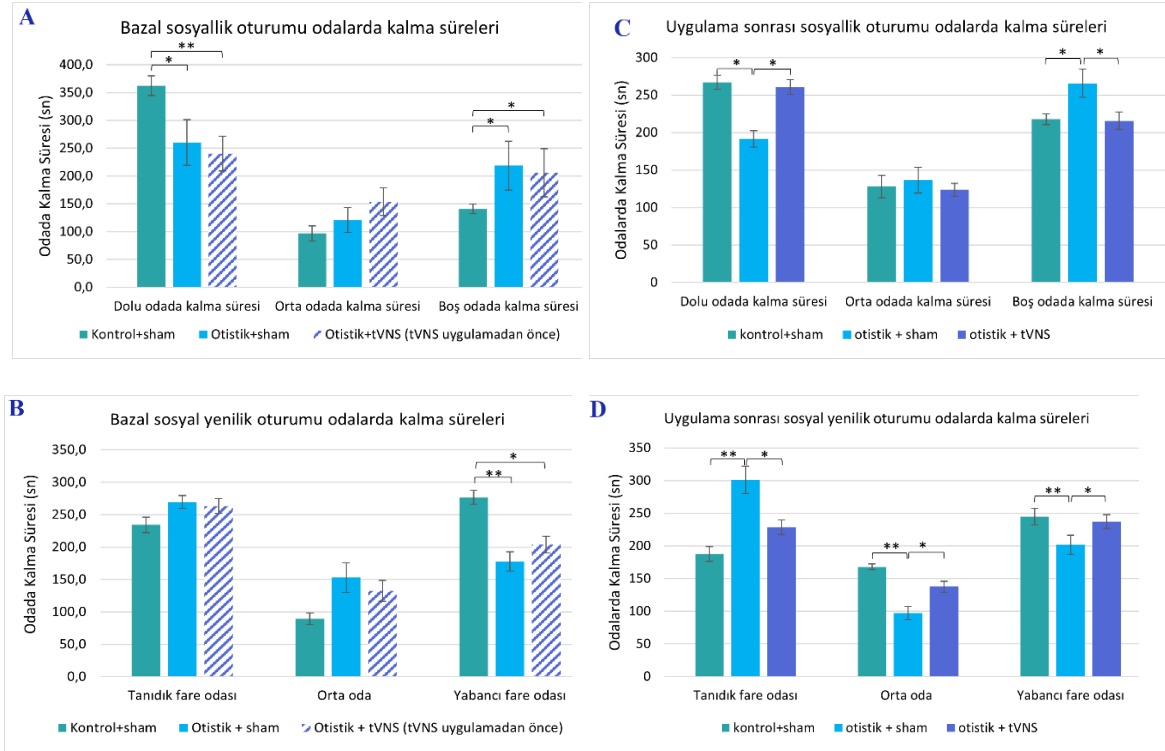
		Kontrol+sham (Ort.±SH)	Otistik+sham (Ort.±SH)	Otistik+tVNS (Ort.±SH)	p
Bazal	Sosyallik indeksi	2,6±0,1	1,3±0,2	1,2±0,2	0,004
	Sosyal yenilik indeksi	1,2±0,3	0,7±0,05	0,8±0,07	0,001
Uygulama sonrası	Sosyallik indeksi	1,3±0,08	0,8±0,1	1,2±0,1	0,001
	Sosyal yenilik indeksi	1,4±0,2	0,7±0,07	1,04±0,1	0,002

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmiştir.

Ort.: Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

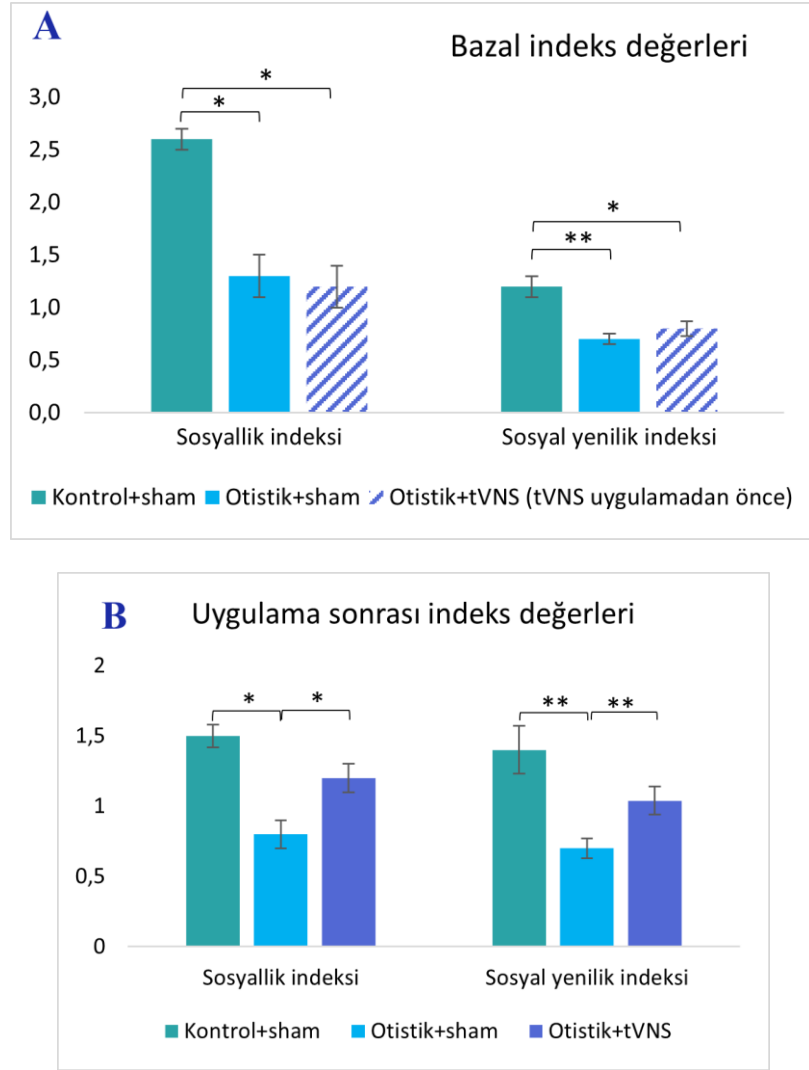
Bazal indeks değerleri incelendiğinde; kontrol+sham grubunun daha fazla sosyalleşme davranışları sergilediği hem sosyallik indeksinin hem de sosyal yenilik indeksinin otistik+sham ve otistik+ tVNS grubundan daha yüksek olduğu bulundu (sırasıyla, $p<0,05$ ve $p<0,01$ ve $p<0,05$). Otistik gruplar homojen dağılımdaydı, gruplar arasında hem sosyallik indeksinde hem de sosyal yenilik indeksinde anlamlı fark yoktu ($p>0,05$), (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2).

Sham ya da tVNS uygulama sonrası sosyal yenilik indeks değerleri incelendiğinde; otistik+tVNS ve kontrol+sham gruplarının, otistik+sham grubuna göre hem sosyal indeksleri ($p<0,05$) hem de sosyal yenilik indekslerinin daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,01$). Kontrol+sham grubu ile otistik+tVNS grubu arasında hem sosyallik indeksinde hem de sosyal yenilik indeksinde anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2).



A. Bazal sosyallik oturumu, B. Bazal sosyal yenilik oturumu, C. Sham ya da tVNS uygulaması sonrası sosyallik oturumu, D. Sham ya da tVNS uygulaması sonrası sosyal yenilik oturumu. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Şekil 4.1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi odada kalma süreleri.



A. Bazal indeks değerleri, **B.** Sham ya da tVNS uygulama sonrası indeks değerleri. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Şekil 4.2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi indeks değerleri.

4.1.2. Aynalı oda testi

Farelerin bazal aynalı oda davranış deneyi 57. günde sham ya da tVNS uygulaması sonrası 85. günde davranış deneyi yapıldı.

Çizelge 4.4. Aynalı oda testi odalarda kalma süreleri

		Kontrol+sham (ort±SH)	Otistik+sham (ort±SH)	Otistik+tVNS (ort±SH)	p
Bazal	Aynalı odada kalma süresi	115,9±3,9	55,6±10,0	61,6±5,4	0,001
	Ön koridorda kalma süresi	69,3±4,8	45,8±6,7	38,4±9,5	0,020
Uygulama sonrası	Aynalı odada kalma süresi	167,6±11,7	33,1±3,1	134,2±4,9	0,001
	Ön koridorda kalma süresi	44,3±6,1	30,1±4,2	44,9±5,2	0,094

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Bazal aynalı oda testinde otistik grupların sosyal anksiyetesinin arttığı görüldü. Kontrol+sham grubunun, otistik+sham ve otistik+tVNS grubundan hem daha uzun süre aynalı odada kaldığı ($p<0,01$), hem de daha uzun süre ön koridorda kaldığı görüldü ($p<0,05$). Otistik gruplar arasında hem aynalı odada kalma süresi hem de anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3).

Sham ya da tVNS uygulaması sonrası veriler incelendiğinde tVNS'nin sosyal anksiyeteyi azalttığı saptandı. Otistik+sham grubunun, kontrol+sham ve otistik+tVNS grubundan daha az aynalı odada kaldığı görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Kontrol+sham grubu ile otistik+tVNS grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Ön koridorda kalma sürelerinde 3 grup arasında anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3).

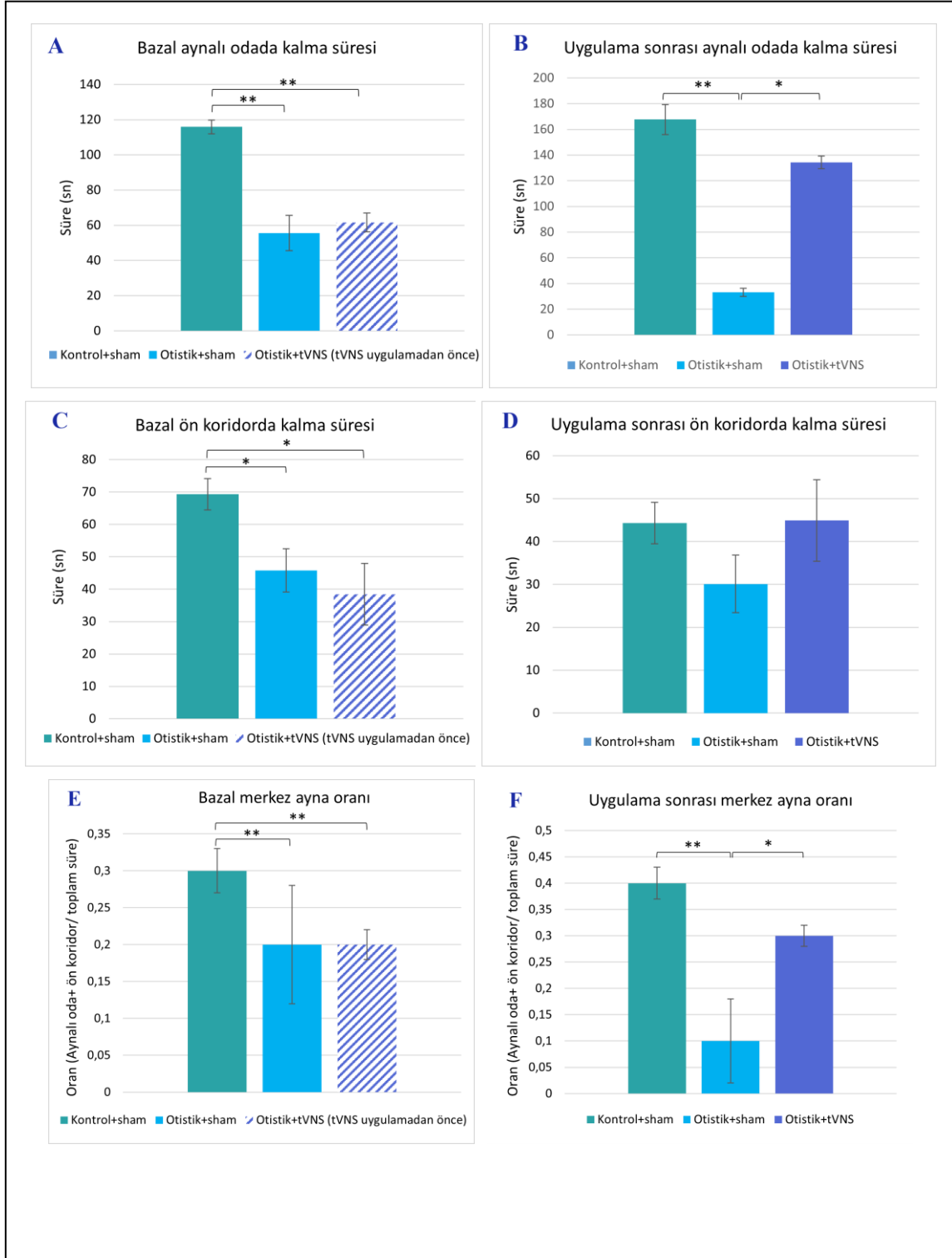
Çizelge 4.5. Aynalı oda testi merkez ayna oranı verileri

		Kontrol+sham	Otistik+sham	Otistik+tVNS	p
		(ort±SH)	(ort±SH)	(ort±SH)	
Bazal	Merkez ayna oranı	0,3±0,03	0,2±0,08	0,2±0,02	0,002
Uygulama sonrası	Merkez ayna oranı	0,4±0,07	0,1±0,01	0,3±0,02	0,001

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. Veriler oran olarak verildi. **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Bazal merkez ayna oranı incelendiğinde, otistik grupların merkez ayna oranının azaldığı görüldü. Kontrol+sham grubunun, otistik+sham ve otistik+tVNS grubundan merkez ayna oranının daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,01$). Otistik gruplar homojen dağılımdaydı, merkez ayna oranı gruplar arası anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.3).

Sham ya da tVNS uygulaması sonrası merkez ayna oranı verileri incelendiğinde, tVNS uygulaması sosyal anksiyeteyi azalttığı belirlendi. Kontrol+sham ve otistik+tVNS grubunun otistik+sham grubuna göre merkez ayna oranı daha yüksekti (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Kontrol+sham grubu ile otistik+tVNS grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.3).



A. Bazal aynalı odada kalma süresi, **B.** Uygulama sonrası aynalı odada kalma süresi, **C.** Bazal ön koridorda kalma süresi **D.** Uygulama sonrası ön koridorda kalma süresi, **E.** Bazal merkez ayna oranı, **F.** Uygulama sonrası merkez ayna oranı. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir, (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Şekil 4.3. Aynalı oda testi verileri.

4.1.3. Açık alan testi

Farelerin bazal açık alan testi 58. günde sham ya da tVNS uygulaması sonrası testi 86. günde yapıldı.

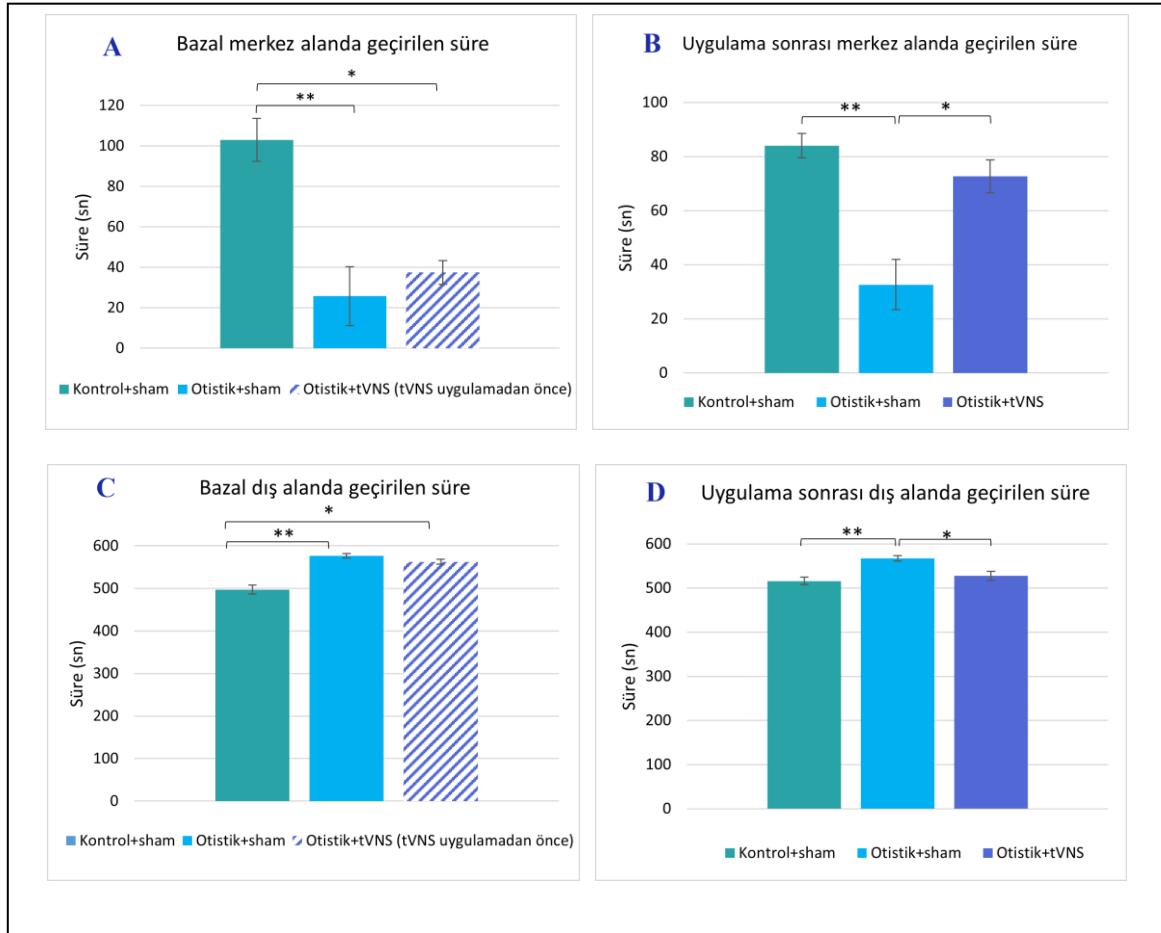
Çizelge 4.6. Açık alan testi verileri

		Kontrol+sham (ort±SH)	Otistik+sham (ort±SH)	Otistik+tVNS (ort±SH)	p
Bazal	Merkez alanda geçirilen süre	102,9±10,6	25,7±14,5	37,4±5,9	0,001
	Dış alanda geçirilen süre	497,0±10,6	576,8±5	562,6±5,9	0,001
Uygulama Sonrası	Merkez alanda geçirilen süre	84,02±4,5	32,6±9,3	72,7±6,1	0,001
	Dış alanda geçirilen süre	515,9±8,5	567,5±6,2	527,7±10,3	0,001

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Tek doz maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde, bazal testte otistik+sham ve otistik+tVNS grubunun kontrol+sham grubuna göre daha az merkez alanlarda (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), daha fazla dış alanlarda kaldığı görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,056$). Otistik gruplar homojen dağılım gösterdi. Hem merkez alanda kalma hem de dış alanda kalma sürelerinde anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.4).

tVNS uygulamasının anksiyete üzerine olumlu etkisi olduğu görüldü. kontrol+sham ve otistik+tVNS grupları otistik+sham grubuna göre merkez alanlarda daha fazla (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) dış alanlarda daha az kaldığı görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Kontrol+sham ve otistik+tVNS grubu arasında hem merkez alanlarda hem de dış alanlarda kalma süresi arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.4).



A. Bazal merkez alanda geçirilen süre. **B.** Uygulama sonrası merkez alanda geçirilen süre **C.** Bazal dış alanda geçirilen süre **D.** Uygulama sonrası dış alanda geçirilen süre Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Şekil 4.4. Açık alan testi verileri

4.1.4. Yükseltilmiş artı labirenti testi

Farelerin bazal yükseltilmiş artı labirenti testi 59. günde, sham ya da tVNS uygulaması sonrası testi 87. günde yapıldı.

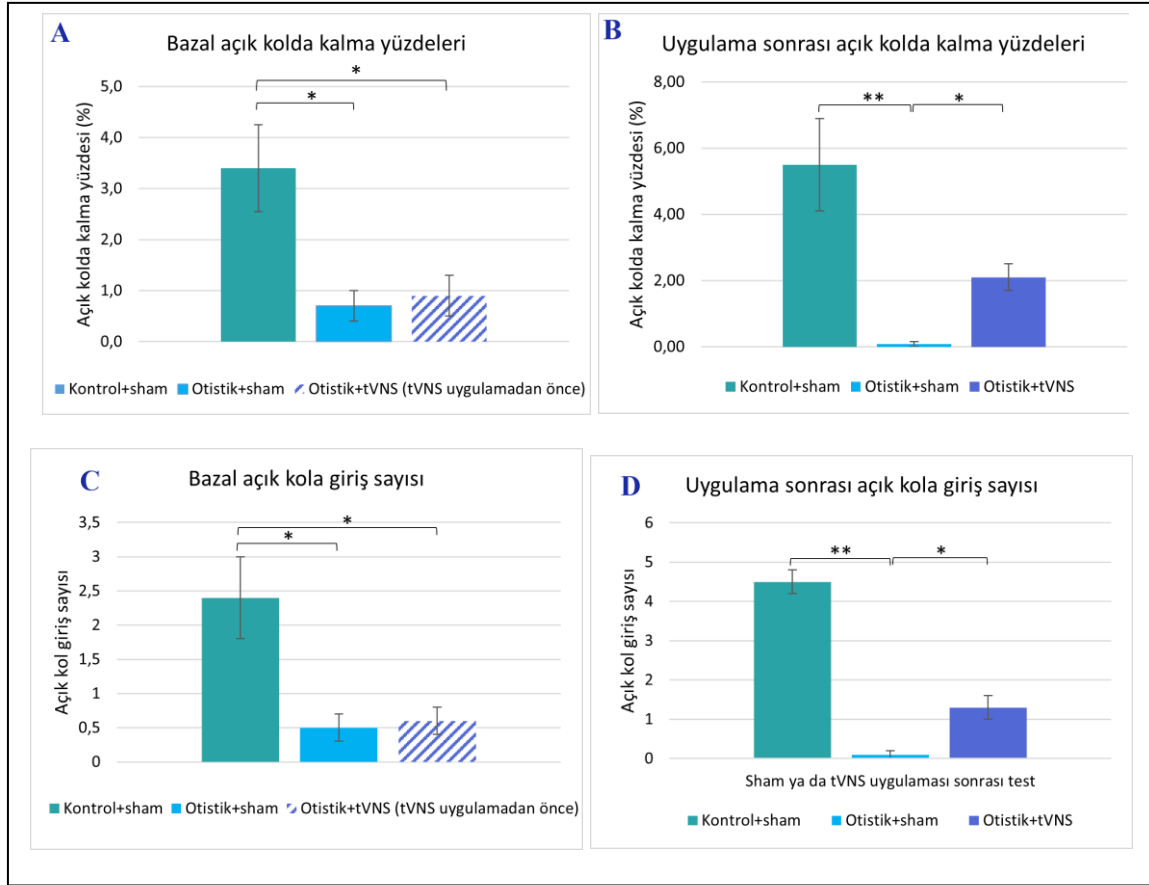
Çizelge 4.7. Yükseltilmiş artı labirenti testi verileri

		Kontrol+sham (ort±SH)	Otistik+sham (ort±SH)	Otistik+tVNS (ort±SH)	p
Bazal	Açık kolda kalma yüzdeleri	%3,4±0,9	%0,7±0,3	%0,9±0,4	0,014
	Açık kola giriş sayıları	2,4±0,6	0,5±0,2	0,6±0,2	0,007
Uygulama sonrası	Açık kolda kalma yüzdeleri	%5,5±1,4	%0,08±0,07	%2,1±0,4	0,001
	Açık kola giriş sayıları	4,5±0,9	0,1±0,1	1,3±0,3	0,001

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi

Tek doz maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde otistik grupların anksiyete düzeylerinin arttığı görüldü. Kontrol+sham grubun otistik+sham ve otistik+tVNS grubundan daha yüksek oranda açık kollarda kaldığı ($p<0,05$) ve daha fazla sayıda açık kollara girdiği saptandı ($p<0,05$). Otistik gruplar homojen dağılım gösterdi. Hem açık kolda kalma yüzdelерinde hem de açık kollara giriş sayılarında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5).

tVNS uygulamasının anksiyete seviyesini azalttığı belirlendi. Kontrol+sham ve otistik+tVNS grubunun, otistik+sham grubuna göre hem daha fazla açık kollarda kaldığı (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) hem de açık kollara giriş sayılarının arttığı saptandı (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Kontrol+sham ve otistik+tVNS grubu arasında hem açık kollarda kalma yüzdesinde hem de açık kollara giriş sayısında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5).



A. Bazal açık kolda kalma yüzdeleri, **B.** Uygulama sonrası açık kolda kalma yüzdeleri, **C.** Bazal açık kollara giriş sayısı, **D.** Uygulama sonrası açık kollara giriş sayısı. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Şekil 4.5. Yükseltilmiş artı labirenti testi verileri

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. Krezil viyole boyalı kesitlerin analiz sonuçları

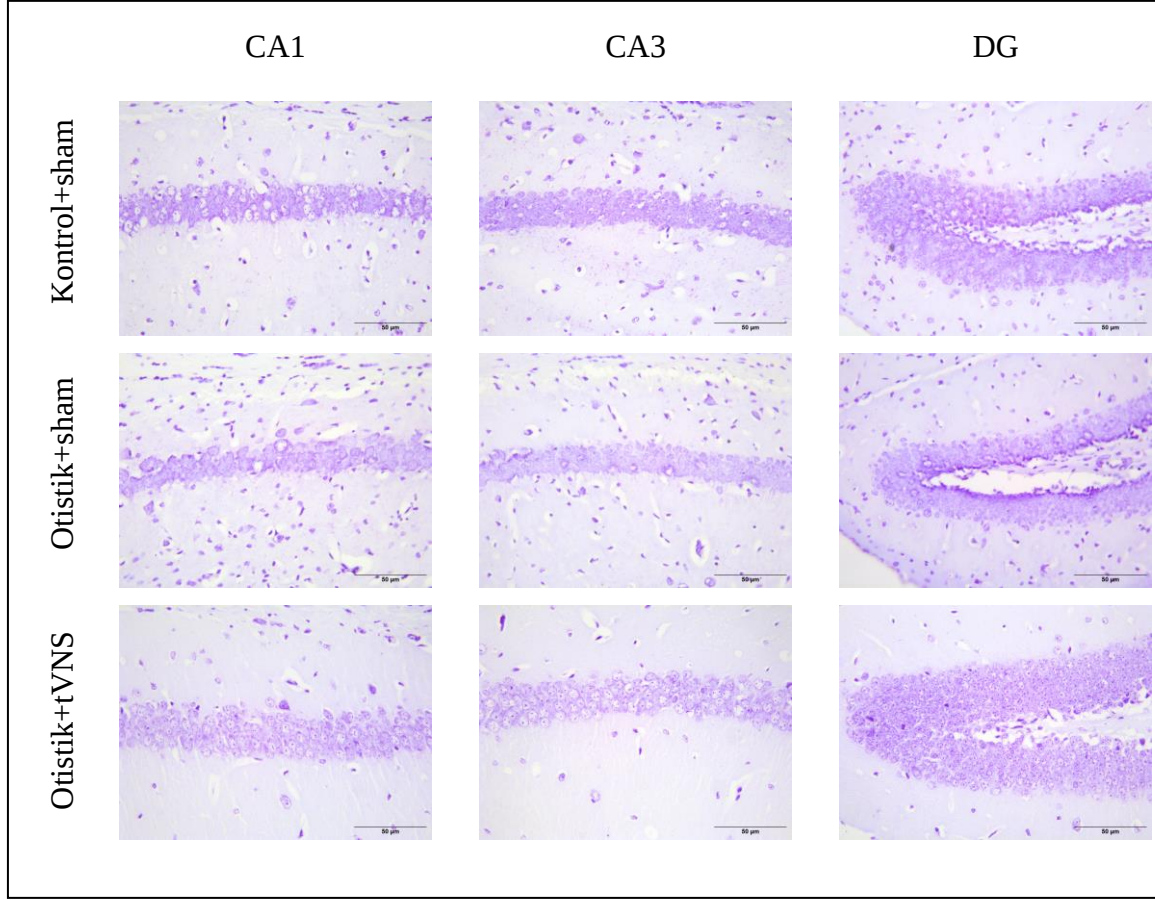
Kontrol+sham, otistik+sham ve otistik+tVNS gruplarındaki erkek farelerin beyin kesitleri krezil viyole ile boyanarak prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala bölgeleri histolojik olarak değerlendirildi.

Krezil viyole ile boyanan kesitlerin hipokampus inceleme bulguları

Kontrol+sham ve otistik+tVNS grupları ile karşılaştırıldığında, otistik+sham grubunda, hem CA1 bölgesi piramidal nöron yoğunluğunun (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) hem de CA3 bölgesi piramidal nöron yoğunluğunun (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az olduğu tespit edildi. Kontrol+sham ve otistik+tVNS grubu arasında hem CA1 bölgesi hem de CA3 bölgesi piramidal hücre yoğunluğu bakımından anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$), (Çizelge 4.8, Şekil 4.6 ve Resim 4.1). Benzer şekilde otistik+sham grubu DG granüler hücre tabakası ortalama kalınlığının, kontrol+sham ve otistik+ tVNS grubuna göre anlamlı düzeyde az olduğu görüldü ($p<0,05$). DG granüler hücre tabakası ortalama kalınlığı bakımından kontrol+sham ve otistik+tVNS grubu arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.6 ve Resim 4.1).

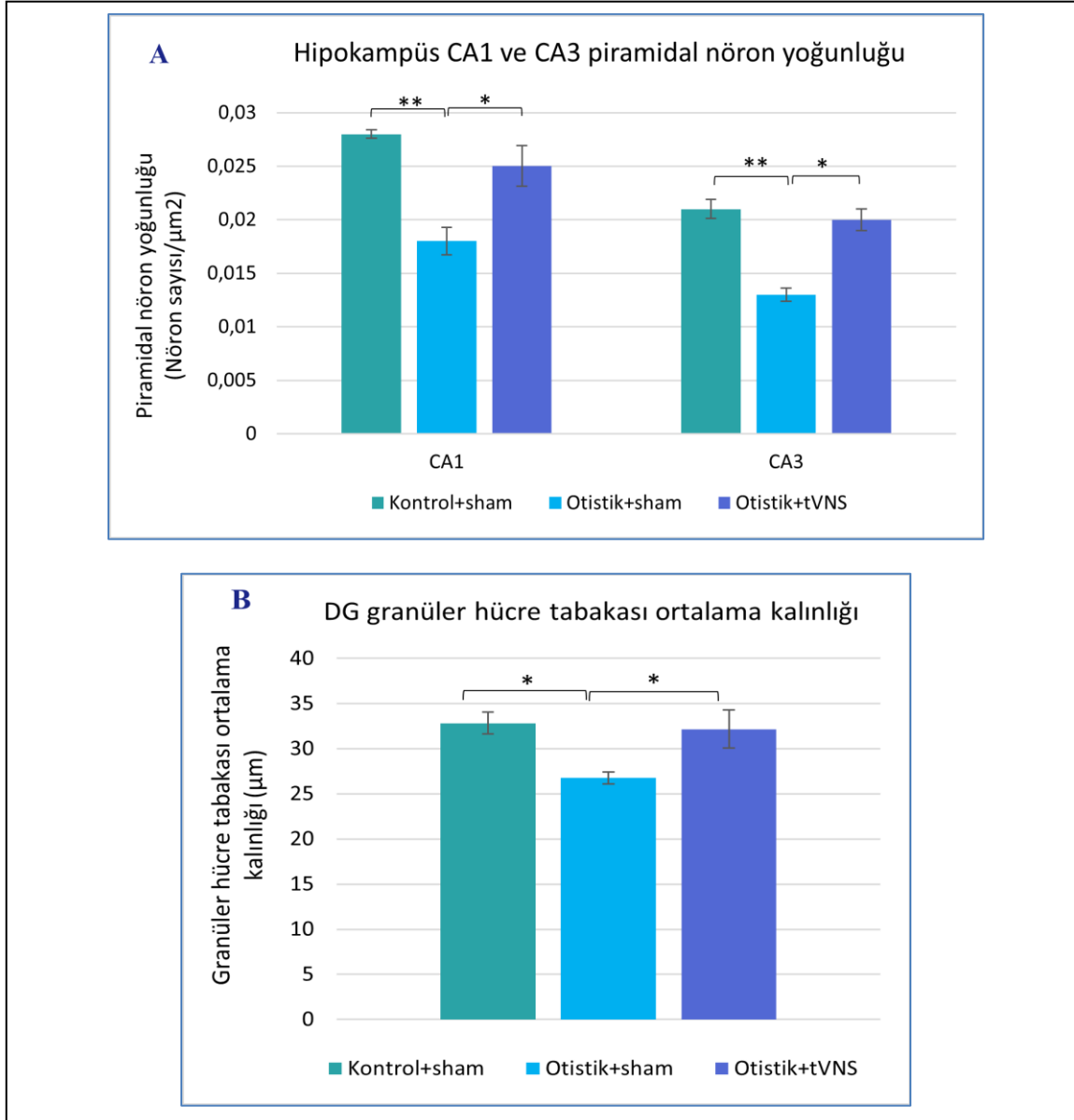
Çizelge 4.8. Krezil viyole ile boyanan kesitlerin hipokampus analiz verileri

	Kontrol+sham (ort $\pm$ SH)	Otistik+sham (ort $\pm$ SH)	Otistik+tVNS (ort $\pm$ SH)	p
CA1 Piramidal nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,028 $\pm$ 0,0004	0,018 $\pm$ 0,0013	0,025 $\pm$ 0,0019	0,007
CA3 Piramidal nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,021 $\pm$ 0,0009	0,013 $\pm$ 0,0006	0,020 $\pm$ 0,0010	0,001
Dentat girus granüler hücre tabakası ortalama kalınlığı (μm)	32,84 $\pm$ 1,23	26,75 $\pm$ 0,65	31,27 $\pm$ 2,13	0,010



Üç grubun hayvanlarına ait mikrograflarda CA1 ve CA3 bölgeleri piramidal hücre tabakasında yer alan, veziküler görünümlü nükleuslarıyla karakterize piramidal nöronların yoğunlukları ve DG bölgesi granüler hücre tabakası izlenmektedir (Büyültme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.1. Hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerine ait krezil viyole boyalı kesit görüntüleri



A. Hipokampus CA1 ve CA3 bölgesi ortalama piramidal nöron yoğunluğu, **B.** Hipokampus DG granüler hücre tabakası ortalama kalınlık ölçüm sonuçları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.6. Krezil viyole boyalı hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerinin sonuçları

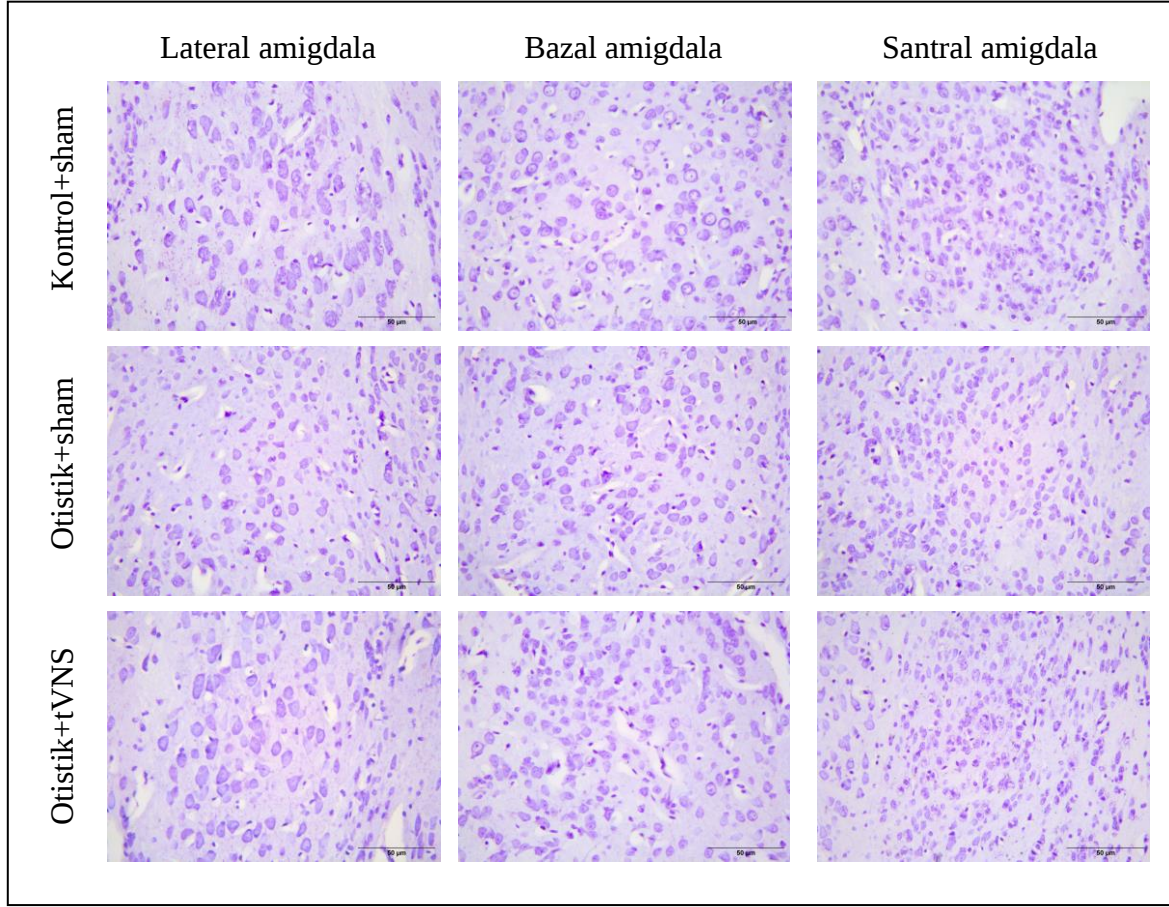
Krezil viyole ile boyanan kesitlerin amigdala inceleme sonuçları

Kontrol+sham ve otistik+tVNS gruplarıyla karşılaştırıldığında, otistik+sham grubunun, göre lateral amigdala (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), bazal amigdala (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) ve santral amigdalasında ($p<0,05$) ortalama nöron yoğunluğunun anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü. Kontrol+sham ve otistik+tVNS grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Aynı şekilde üç grup arasında medial amigdala nöron yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Bu dört amigdala alt bölgesi bütün olarak değerlendirildiğinde ise yine otistik+sham grubunun ortalama nöron yoğunluğunun, kontrol+sham ve otistik+ tVNS gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde daha düşük olduğu izlendi ($p<0,01$) (Çizelge 4.9, Şekil 4.7 ve Resim 4.2).

Çizelge 4.9. Krezil viyole ile boyalı kesitlerin amigdala analiz verileri

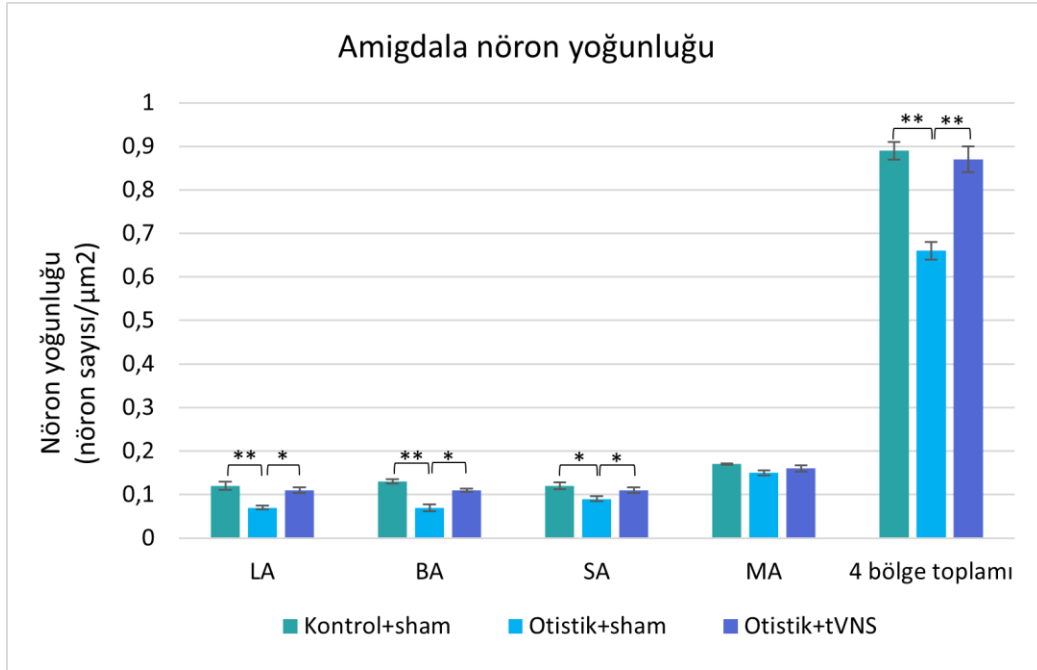
	Kontrol+sham Ort±SH	Otistik+sham Ort±SH	Otistik+tVNS Ort±SH	p
LA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,12±0,01	0,07±0,004	0,11±0,006	0,001
BA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,13±0,005	0,07±0,008	0,11±0,003	0,001
SA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,12±0,008	0,09±0,006	0,11±0,006	0,036
MA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,17±0,002	0,15±0,006	0,16±0,007	0,265
LA+BA+SA+MA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,89±0,02	0,66±0,02	0,87±0,03	0,001

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmektedir. **LA:** lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, **Ort:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi



Amigdala alt çekirdekleri olan LA, BA ve SA bölgelerine ait krezil viyole boyalı görüntüleri izlenmektedir. (Büyütlme 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.2. Amigdala krezil viyole boyalı kesit görüntüleri



LA: lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala. Nöron yoğunluğu (Nöron sayısı/ μm^2), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.7. Krezil viyole boyalı amigdala kesitleri analiz sonuçları

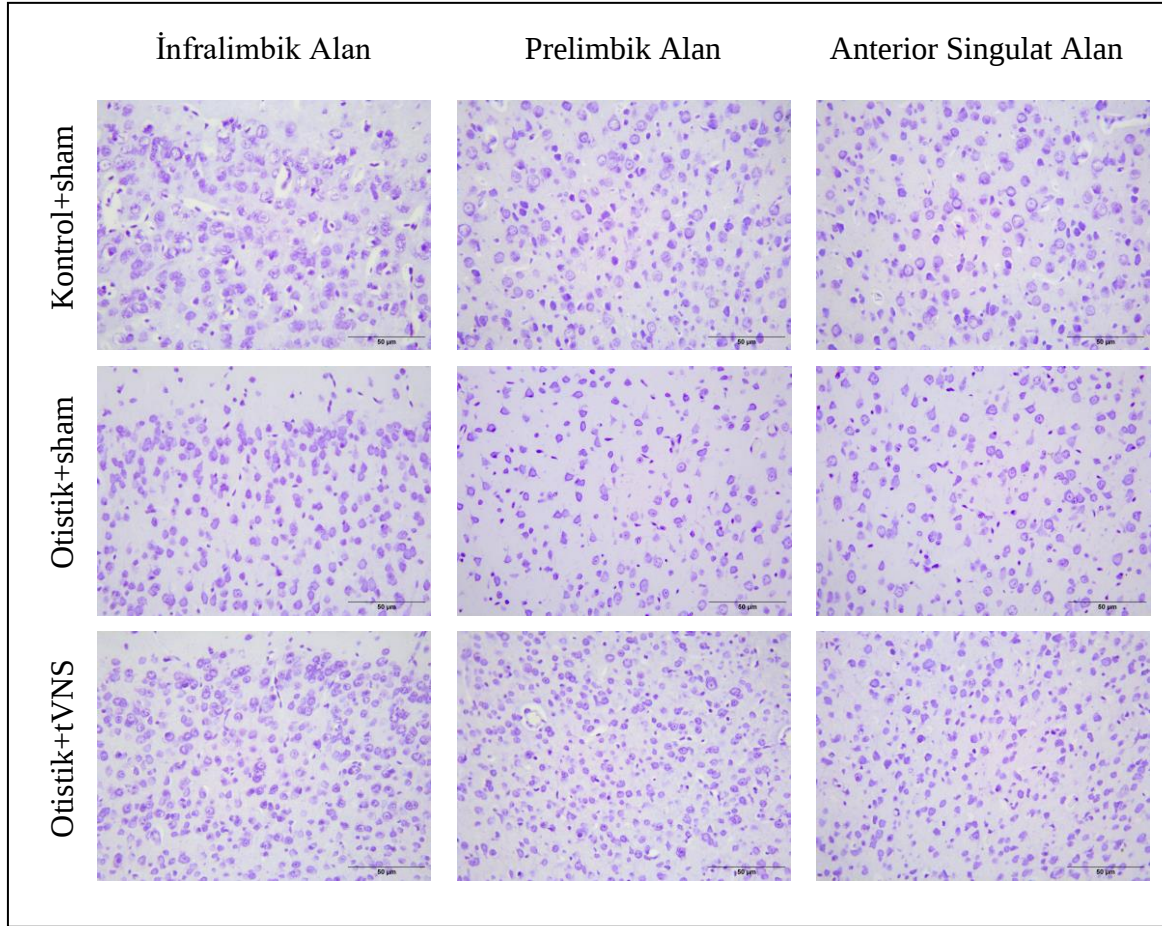
Krezil viyole ile boyanan kesitlerin prefrontal korteks inceleme sonuçları

Kontrol+sham ve otistik+tVNS gruplarıyla karşılaştırıldığında, otistik+sham grubunun infralimbik ($p<0,05$), prelimbik (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) ve anterior singulat alanlarında ($p<0,01$) nöron yoğunluğunun belirgin bir biçimde az olduğu saptandı. Koyu nöron görünümlü hücrelerde artış ek olarak nöron gövdelerinin morfolojisinde bozulma, nöron gövdelerinde küçülme fark edildi. Kontrol+sham grubu ile otistik+tVNS grubu arasında infralimbik alan, prelimbik alan ve anterior singulat alanda nöron yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$), (Çizelge 4.10, Şekil 4.8 ve Resim 4.3).

Çizelge 4.10. Krezil viyole ile boyalı kesitlerin prefrontal korteks analiz verileri

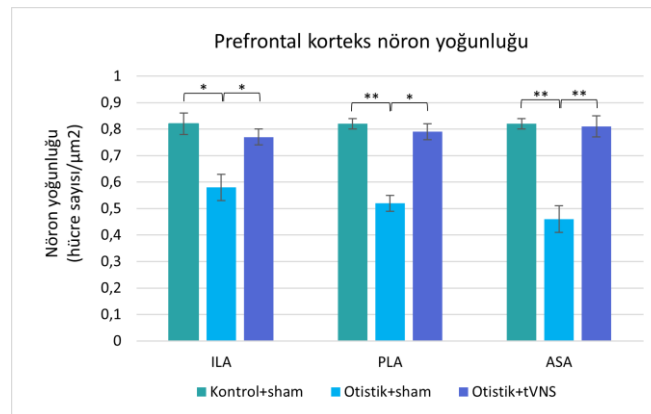
	Kontrol+sham	Otistik+sham	Otistik+tVNS	p
	Ort $\pm$ SH	Ort $\pm$ SH	Ort $\pm$ SH	
ILA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,82 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,03	0,008
PLA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,82 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,03	0,001
ASA ortalama nöron yoğunluğu (nöron sayısı/ μm^2)	0,82 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,04	0,001

Veriler Ort. $\pm$ SH olarak ifade edilmektedir. **ILA:** infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan, **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi



Prefrontal kortekse ait ILA, PLA ve ASA alanlarına ait kretil viyole boyalı görüntüleri izlenmektedir. (Büyültme 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.3. Prefrontal korteks kretil viyole boyalı kesit görüntüleri



ILA: infrolimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan. (* p<0,05, ** p<0,01), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.8. Kretil viyole boyalı prefrontal korteks kesitleri analiz sonuçları

4.2.2. BDNF ve DCX ile boyanan kesitlerin immünreaktivite sonuçları

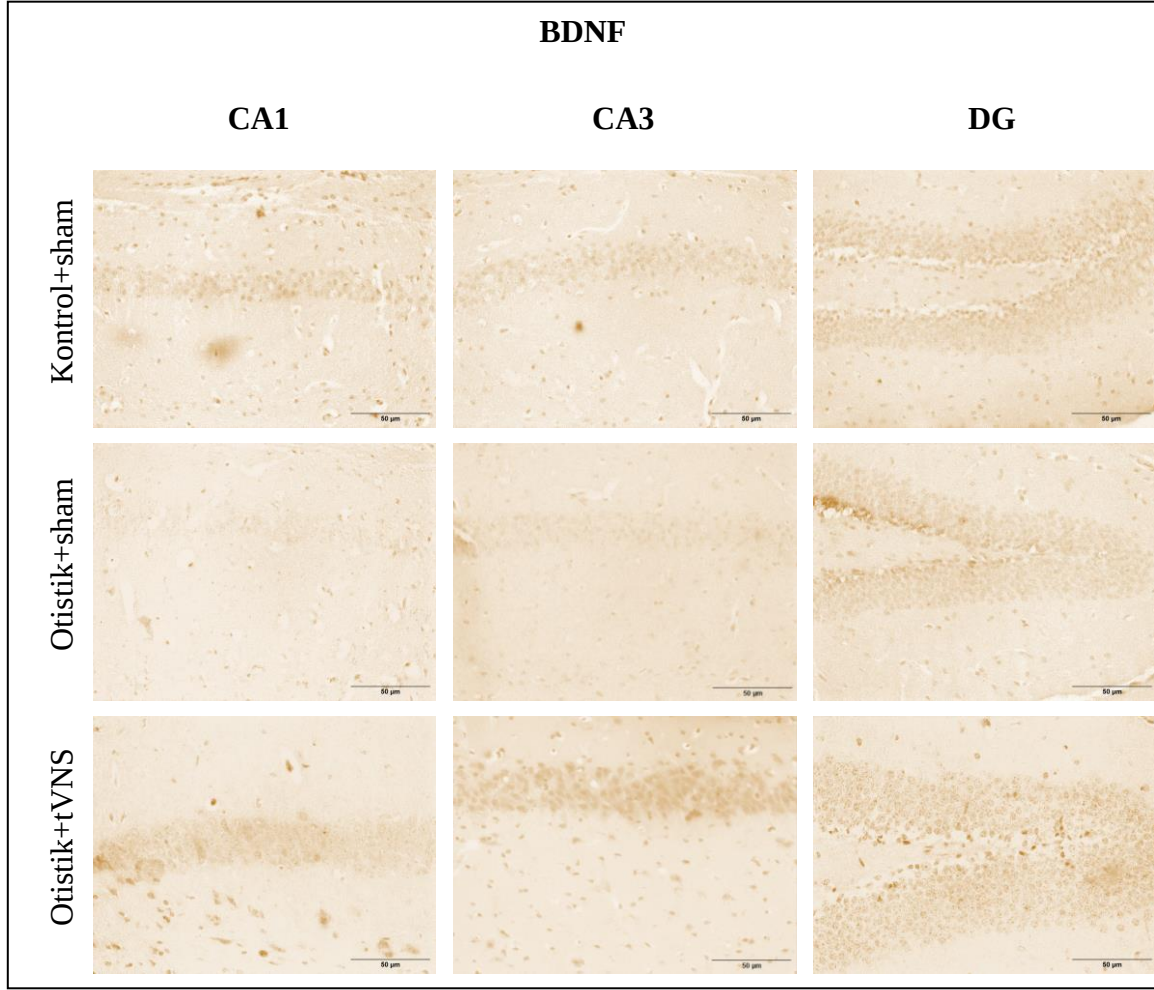
BDNF ve DCX ile işaretlenen hipokampus kesitlerinin immünreaktivite analiz sonuçları

Maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde, kontrol+sham ve otistik+tVNS gruplarıyla karşılaştırıldığında, otistik+sham grubun hipokampus CA1 bölgesinde (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), hipokampus CA3 bölgesinde ($p<0,01$) ve DG alanlarında ($p<0,01$) BDNF immünreaktivitesinin belirgin biçimde düşük olduğu saptandı. Otistik+tVNS grubu ile kontrol+sham grubu, BDNF immünreaktivite bakımdan karşılaştırıldığında hipokampus CA1 bölgesinde, CA3 bölgesinde ve DG alanlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.11, Şekil 4.9 ve Resim 4.4).

Çizelge 4.11. BDNF ile boyanan hipokampus kesitleri immünreaktivite sonuçları

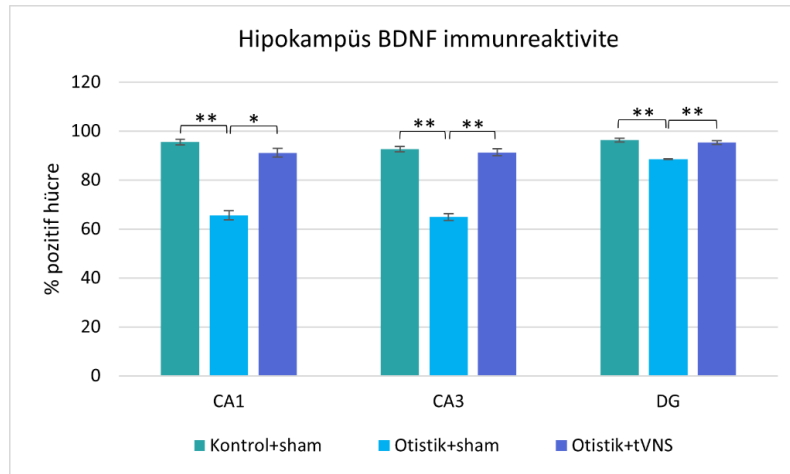
		Kontrol+sham (Ort±SH)	Otistik+sham (Ort±SH)	Otistik+tVNS (Ort±SH)	p
BDNF immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	CA1	95,5±1,2	65,5±1,9	91,1±1,8	0,001
	CA3	92,7±1,1	74,9±1,34	91,3±1,4	0,001
	DG	96,3±0,8	88,5±0,1	95,3±0,8	0,001

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. **CA1:** cornu ammonis 1, **CA3:** cornu ammonis 3, **DG:** dentat girus, **ort:** Ortalama, **sh:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi



(DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.4. Grupların BDNF antikoruyla işaretlenen hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgeleri görüntüleri



CA1: cornu ammonis 1, **CA3:** cornu ammonis 3, **DG:** dentat girus, **BDNF:** beyin-türevli nörotrofik faktör. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

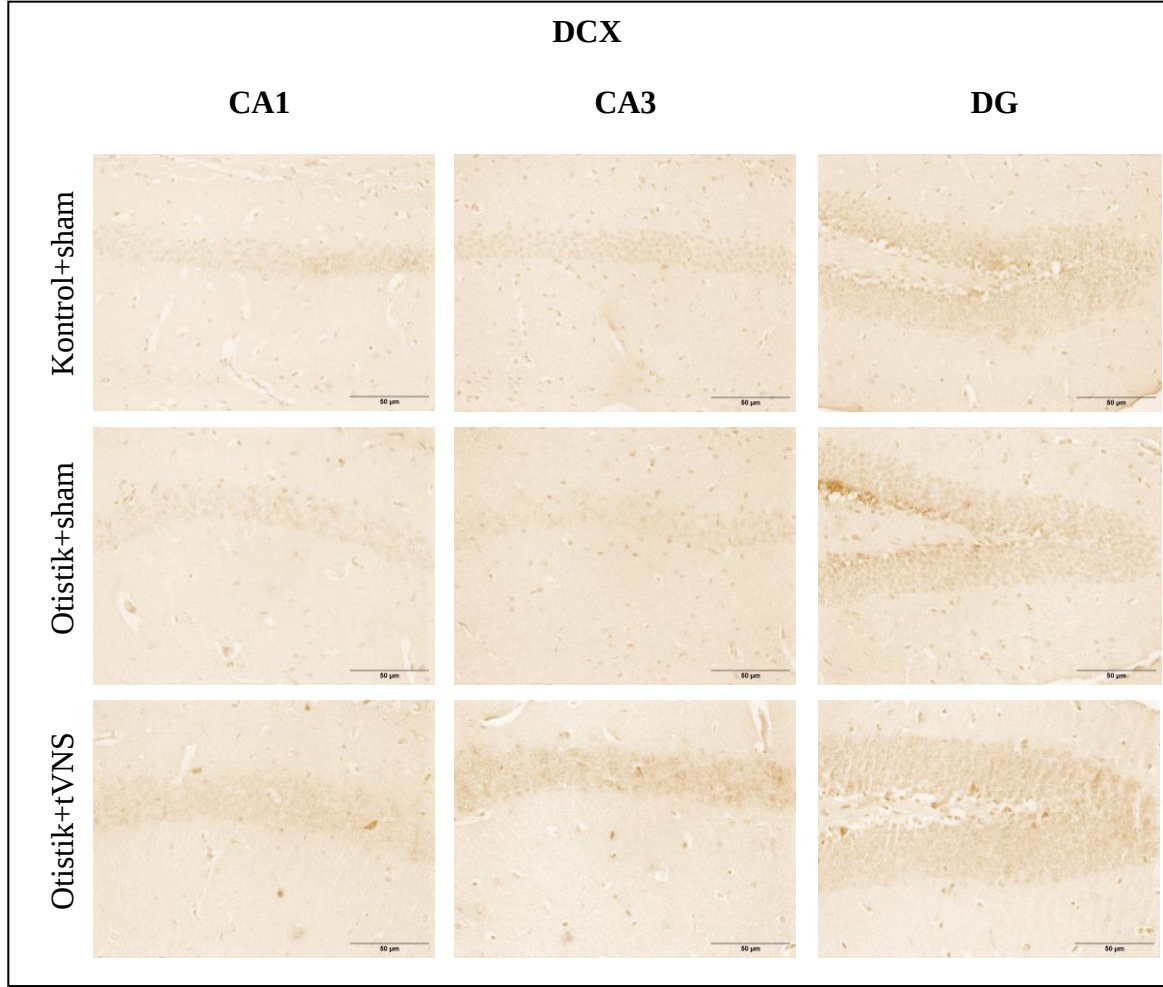
Şekil 4.9. Hipokampus BDNF immün boyama analiz sonuçları.

Benzer şekilde kontrol+sham ve otistik+tVNS grubuyla karşılaştırıldığında, otistik+sham grubun hipokampus CA1 bölgesinde (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), hipokampus CA3 bölgesinde (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) ve DG alanlarında (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) DCX immünreaktivitesinin belirgin olarak az olduğu saptandı. Otistik+tVNS grubu ile kontrol+sham grubu, DCX immünreaktivite bakımından karşılaştırıldığında hipokampus CA1 bölgesinde, CA3 bölgesinde ve DG alanlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.12, Şekil 4.10 ve Resim 4.5).

Çizelge 4.12. DCX ile boyanan hipokampus kesitleri immünreaktivite sonuçları

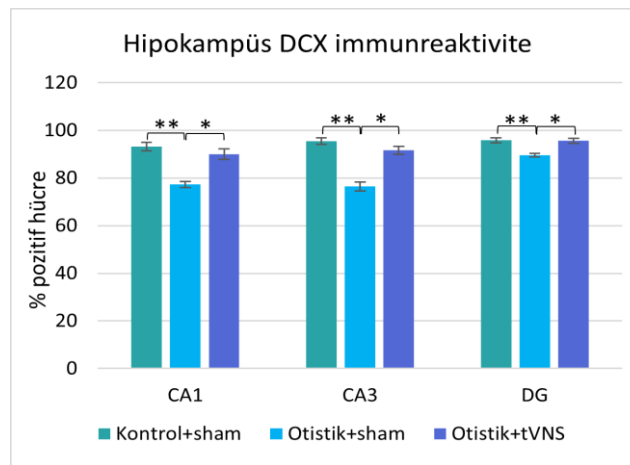
		Kontrol+sham (Ort±SH)	Otistik+sham (Ort±SH)	Otistik+tVNS (Ort±SH)	p
DCX immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	CA1	93,1±1,8	77,3±1,2	90,0±2,3	0,001
	CA3	95,5±1,3	76,5±1,9	91,6±1,6	0,001
	DG	95,8±1,1	89,6±0,8	93,6±1,1	0,002

Veriler Ort. ± SH olarak ifade edilmektedir. **CA1:** cornu ammonis 1, **CA3:** cornu ammonis 3, **DG:** dentat girus, **ort:** Ortalama, **sh:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi



(DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.5. Grupların DCX antikoruyla işaretlenen hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgeleri görüntüleri



CA1: cornu ammonis 1, **CA3:** cornu ammonis 3, **DG:** dentat girus, **DCX:** doublecortin. (* p<0,05, ** p<0,01), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.10. Hipokampus DCX immün boyama analiz sonuçları.

BDNF ve DCX ile işaretlenen amigdala kesitlerinin immünreaktivite analiz sonuçları

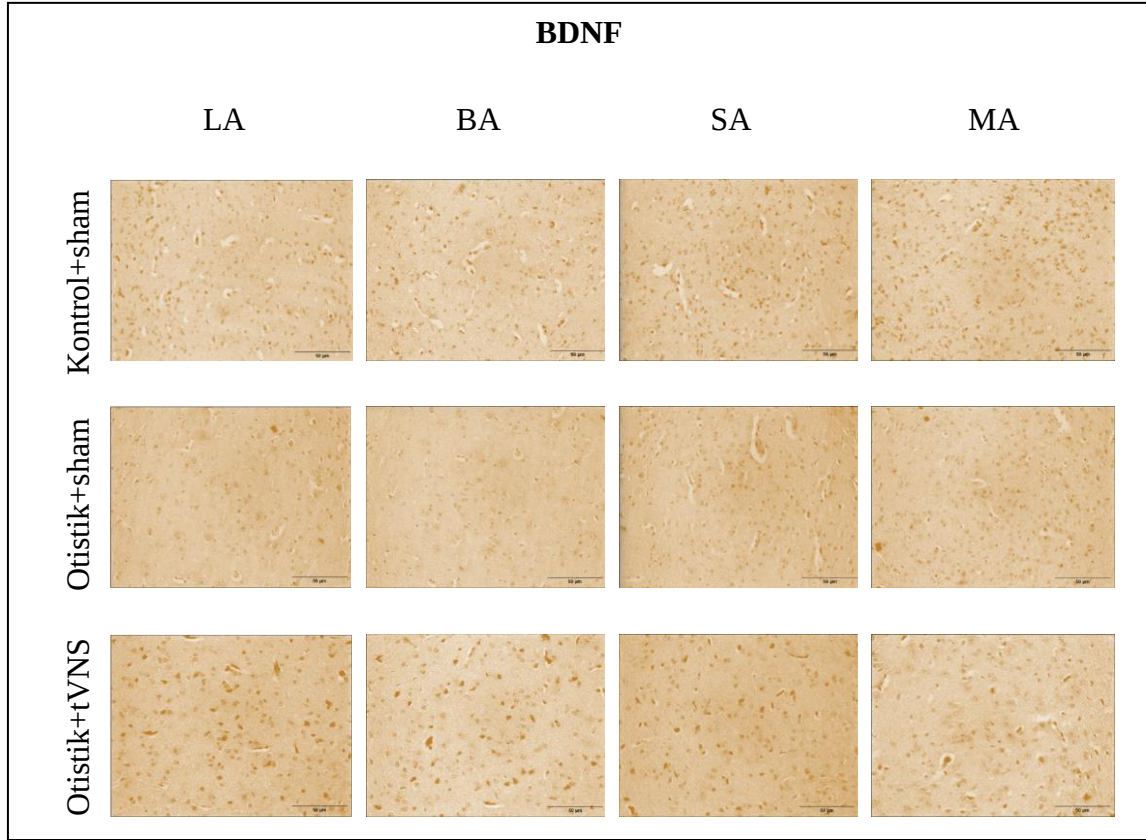
Maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde, BDNF immünreaktivitesi bakımından kontrol+sham ve otistik+tVNS grubuyla karşılaştırıldığında, otistik+ sham grubunun lateral amigdala (LA) (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), bazal amigdala (BA) (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), medial amigdala (MA) (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) ve santral amigdala (SA) (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) BDNF immünreaktivitesinin belirgin düzeyde az olduğu saptandı.

Kontrol+sham grubu ile karşılaştırıldığında, otistik+tVNS grubunun LA, BA, MA ve SA alt çekirdeklerinin BDNF ekspresyonunun benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir immünreaktivite farkı olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.13, Şekil 4.11 ve Resim 4.6).

Çizelge 4.13. Amigdala alt bölgelerinin BDNF immünreaktivite analiz sonuçları

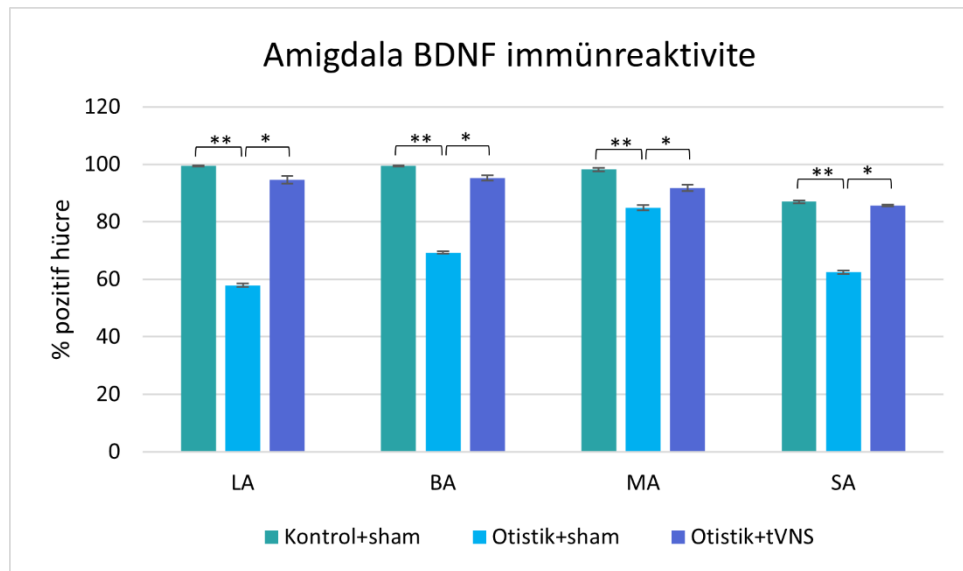
		Kontrol+sham (Ort±SH)	Otistik+sham (Ort±SH)	Otistik+tVNS (Ort±SH)	p
BDNF immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	LA	99,4±0,3	57,9±0,6	94,6±1,3	0,001
	BA	99,4±0,3	69,3±0,4	95,2±0,9	0,003
	MA	98,2±0,6	84,9±0,9	91,8±1,1	0,001
	SA	87±0,5	62,5±0,6	85,7±0,3	0,002

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmektedir. **LA:** lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi.



LA: lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, (DAB, Büyültme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.6. Grupların BDNF antikorlarıyla işaretli amigdala görüntüleri



LA: lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, **BDNF:** beyin-türevli nörotrofik faktör (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.11. BDNF antikoruyla işaretli LA, BA, SA ve MA bölgeleri immünreaktivite analiz sonuçları.

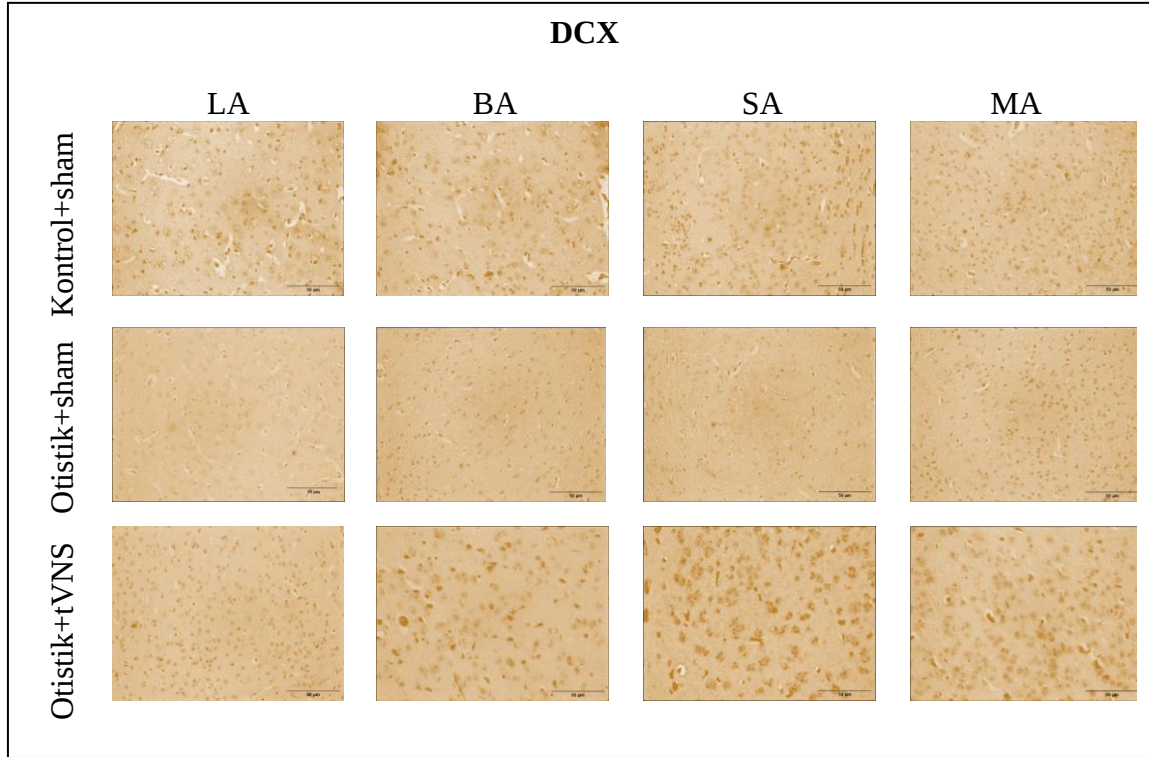
Çizelge 4.14. Amigdala alt bölgelerinin DCX immünreaktivite analiz sonuçları

		Kontrol+sham (Ort±SH)	Otistik+sham (Ort±SH)	Otistik+tVNS (Ort±SH)	p
BDNF immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	LA	94,8±0,9	62,8±0,3	93,8±0,7	0,001
	BA	92,6±1	57,8±0,4	90,5±0,6	0,003
	MA	92,2±0,7	73,5±1,1	89,7±1,3	0,001
	SA	93,1±0,4	69,0±0,1	91,2±0,5	0,002

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmektedir. **LA:** lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi.

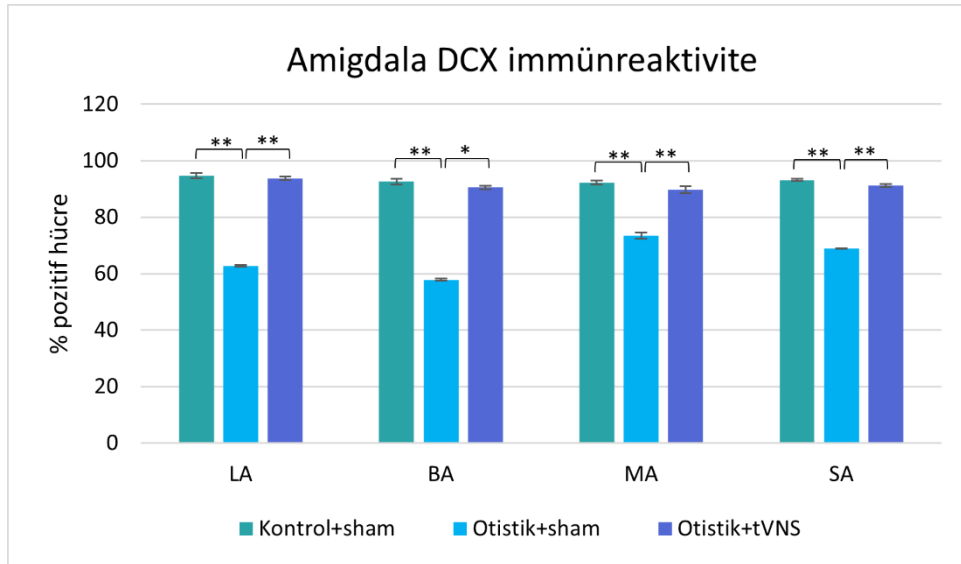
Benzer şekilde kontrol+sham ve otistik+tVNS grubuyla karşılaştırıldığında, otistik+sham grubun LA ($p<0,01$), BA (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$), MA ($p<0,01$) ve SA ($p<0,01$) alt çekirdeklerinin DCX immünreaktivitesinin belirgin biçimde düşük olduğu saptandı.

Kontrol+sham grubu ile karşılaştırıldığında, otistik+tVNS grubunun LA, BA, MA ve SA alt çekirdeklerinde DCX ekspresyonunun benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir immünreaktivite farkı olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.14, Şekil 4.12 ve Resim 4.7).



LA: lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, (DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikroyraflar için 50 µm).

Resim 4.7. Grupların DCX antikoruyla işaretli amigdala görüntüleri



LA: lateral amigdala, **BA:** bazal amigdala, **SA:** santral amigdala, **MA:** medial amigdala, **DCX:** doublecortin. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.12. DCX antikoruyla işaretli LA, BA, SA ve MA bölgeleri immünreaktivite analiz sonuçları

BDNF ve DCX ile boyanan prefrontal korteks kesitlerinin immunreaktivite sonuçları

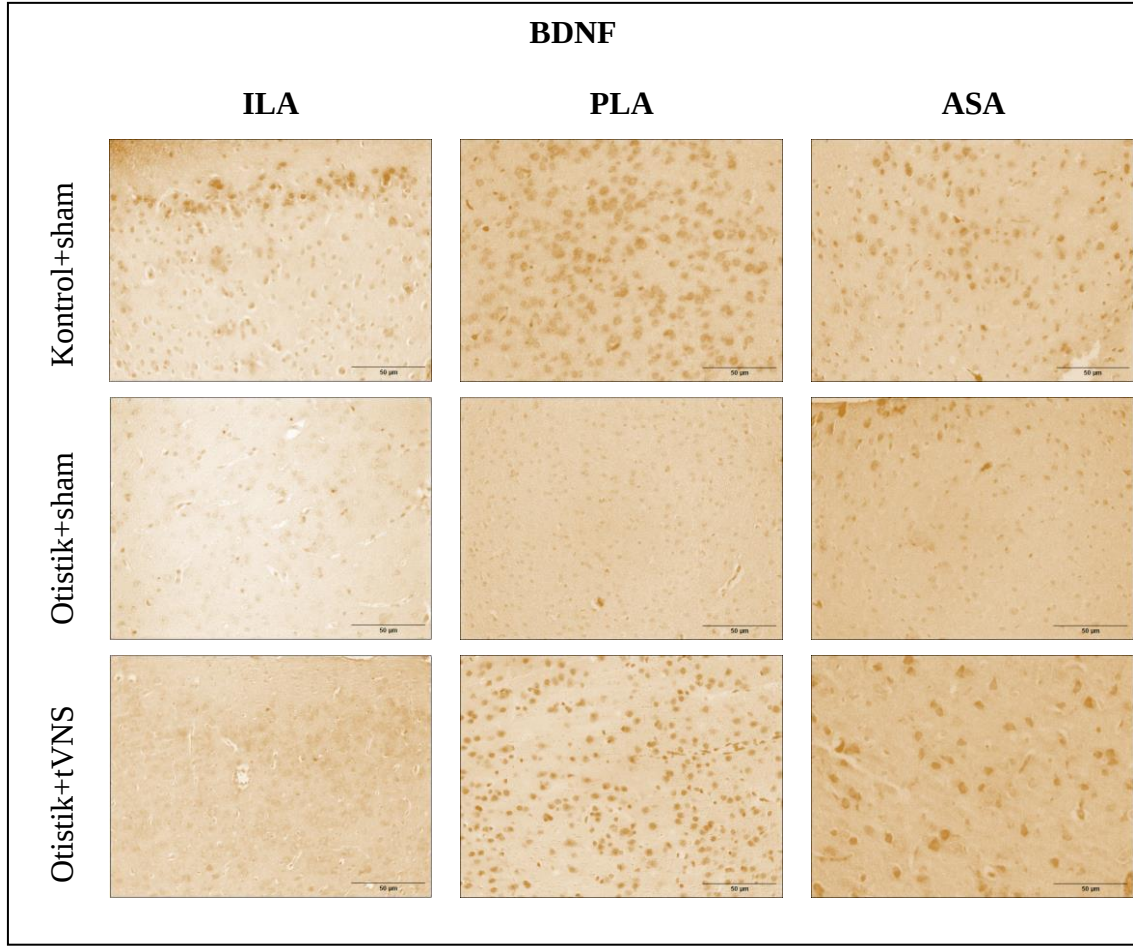
Maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde, prefrontal korteks eksternal granüler ve eksternal piramidal tabakalarındaki nöronlarda ve daha alt tabakalarda bulunan büyük piramidal nöronlarda BDNF ve DCX immünreaktivitesinin azaldığı belirlendi. BDNF immünreaktivitesi bakımından kontrol+sham ve otistik+tVNS grupları ile karşılaştırıldığında, otistik+sham grubunun infralimbik alan (ILA) ($p<0,01$), prelimbik alan (PLA) ($p<0,01$) ve anterior singulat alanda (ASA) ($p<0,01$) BDNF immünreaktivitesinin belirgin olarak düşük olduğu saptandı.

Kontrol+sham grubu ile karşılaştırıldığında, otistik+tVNS grubunun BDNF ve DCX ekspresyonunun ILA, PLA ve ASA’ında benzer düzeyde olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.15, Şekil 4.13 ve Resim 4.8).

Çizelge 4.15. Prefrontal korteks BDNF immünreaktivite analiz sonuçları

		Kontrol+sham	Otistik+sham	Otistik+tVNS	p
		Ort±sh	Ort±sh	Ort±sh	
BDNF immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	ILA	90,5±1,1	60,9±0,9	88,7±1,6	0,001
	PLA	95,1±1	57,8±0,4	91,8±0,6	0,003
	ASA	89,2±0,9	62,5±0,9	86,7±1,8	0,001

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmektedir. **ILA:** infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan, **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi.



ILA: infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan, (DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.8. Grupların BDNF antikoruyla işaretli prefrontal korteks görüntüleri

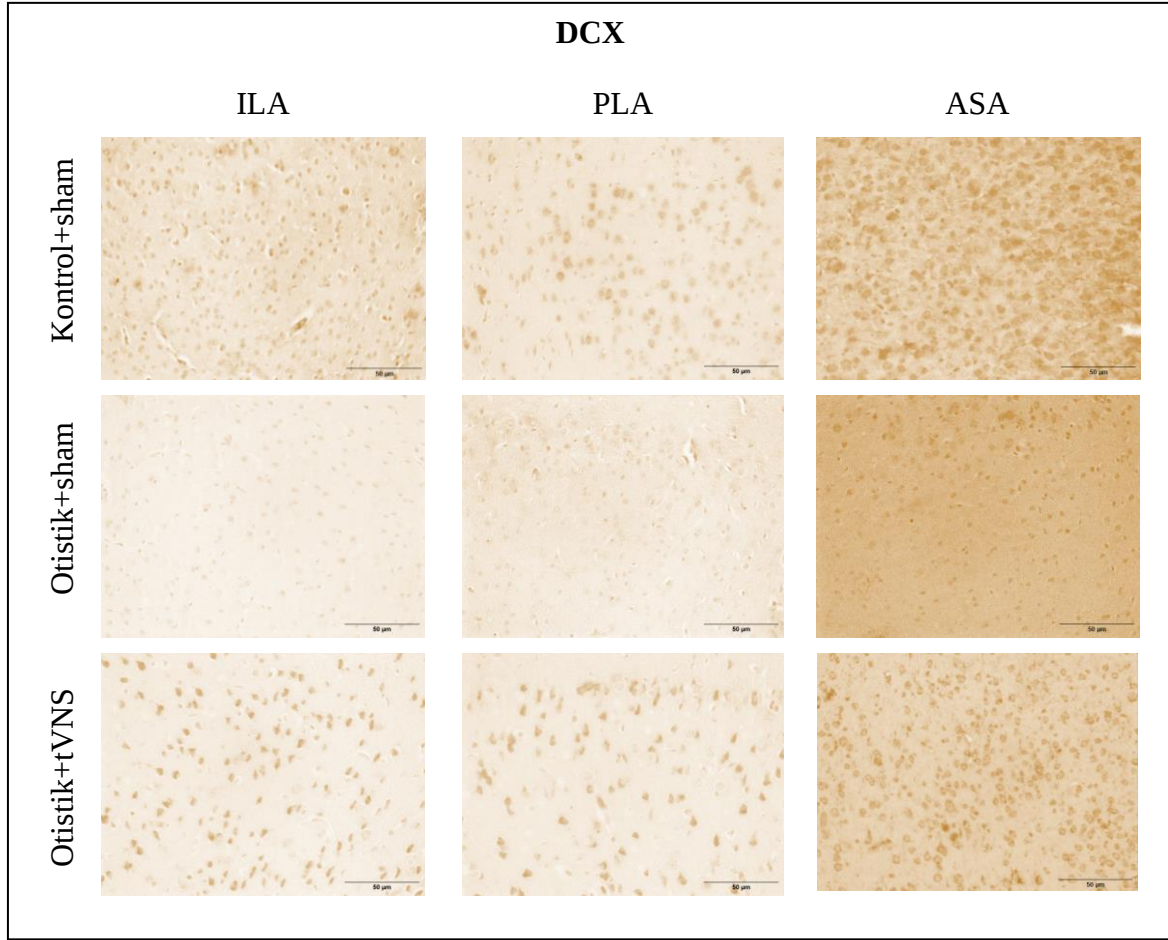
Çizelge 4.16. Prefrontal korteks DCX immünreaktivite analiz sonuçları

		Kontrol+sham	Otistik+sham	Otistik+tVNS	p
		Ort±sh	Ort±sh	Ort±sh	
DCX immünreaktivitesi (% pozitif hücre)	ILA	91,2±1,2	62,1±1,8	89,5±1,8	0,001
	PLA	92,7±1,0	52,3±0,9	87,9±1,3	0,002
	ASA	94,3±1,6	61,9±1,3	88,9±1,5	0,001

Veriler Ort.±SH olarak ifade edilmektedir. **ILA:** infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan, **Ort.:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **p:** Kruskal Wallis Testi.

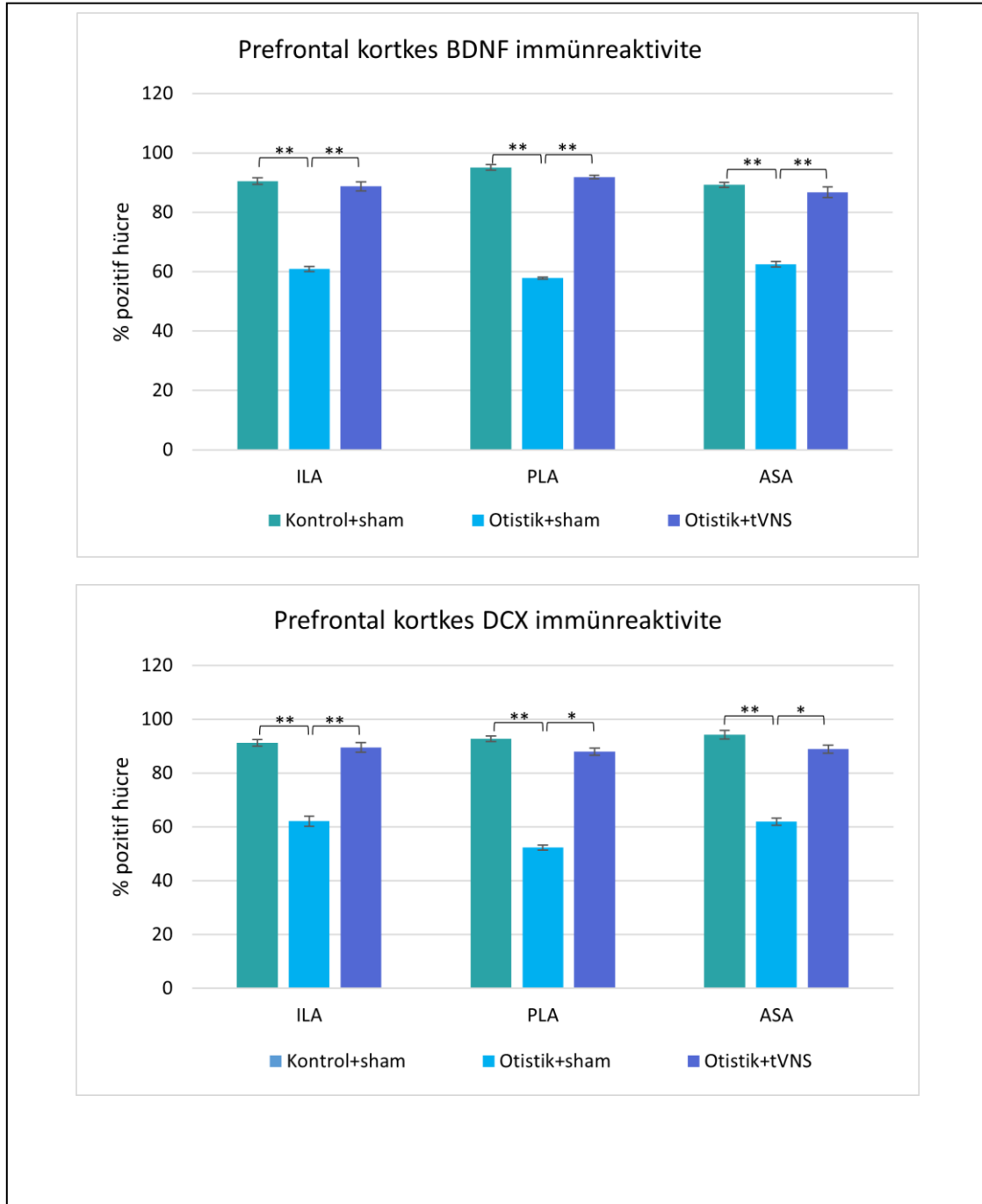
Benzer şekilde DCX ekspresyonu bakımından, kontrol+sham ve otistik+tVNS grupları ile karşılaştırıldığında, otistik+ sham grubunun ILA ($p<0,01$), PLA (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) ve ASA alanlarında (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) DCX immünreaktivitesinin anlamlı düzeyde az olduğu saptandı (Çizelge 4.16, Şekil 4.13 ve Resim 4.9).

Kontrol+sham grubu ile karşılaştırıldığında, otistik+tVNS grubunun BDNF ve DCX ekspresyonunun ILA, PLA ve ASA’ında benzer düzeyde olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Çizelge 4.16, Şekil 4.13 ve Resim 4.9).



ILA: infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior singulat alan, (DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.9. Grupların DCX antikoruyla işaretli prefrontal kortkes görüntüleri



ILA: infralimbik alan, **PLA:** prelimbik alan, **ASA:** anterior cingulat alan, **BDNF:** beyin-türevli nörotrofik faktör, **DCX:** doublecortin. (* p<0,05, ** p<0,01), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

Şekil 4.13. BDNF ve DCX antikorlarıyla işaretli prefrontal kortkes immünreaktivite analiz sonuçları.

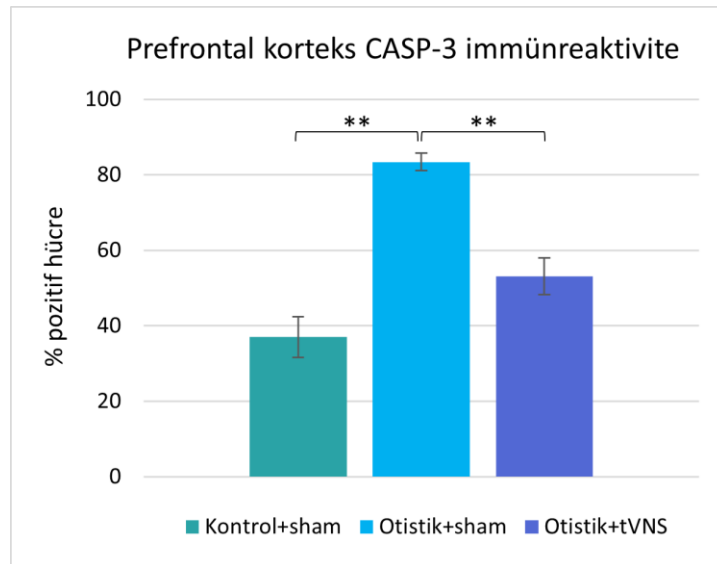
4.2.3. Kaspaz-3 ile işaretlenen prefrontal korteks kesitlerinin immünreaktivite analiz sonuçları

Krezil viyole boyalı preparasyonların değerlendirilmesi sırasında dikkati çeken “koyu nöron” görünümündeki nöronlara yönelik yapılan aktif kaspaz-3 (aktif CASP-3) antikoru ile de işaretleme sonucunda, maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde, doğan erkek yavrularda prefrontal korteks eksternal granüler ve eksternal piramidal tabakalarındaki nöronlarda ve daha alt tabakalarda bulunan büyük piramidal nöronlarda aktif AKTİF CASP-3 immünreaktivitesinde artış olduğu görüldü. Otistik+sham grubunda (%37±5,4), kontrol+sham (%83,4±2,3) ve otistik+tVNS grubuna (%53,1±4,9) göre daha yüksek AKTİF CASP-3 immünreaktivitesi görüldü (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$). Otistik+tVNS grubunda tVNS uygulamasının aktif CASP-3 aktivitesinde azalmaya neden olduğu görüldü. Kontrol+sham grubu ile otistik + tVNS grubu arasında kaspaz-3 ekspresyonu bakımından anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). (Şekil 4.14, ve Resim 4.10).



(DAB, Büyütlme: 400×, ölçek çubuğu tüm mikrograflar için 50 µm).

Resim 4.10. Grupların kaspaz-3 antikoruyla işaretli prefrontal korteks görüntüleri



(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), (Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir).

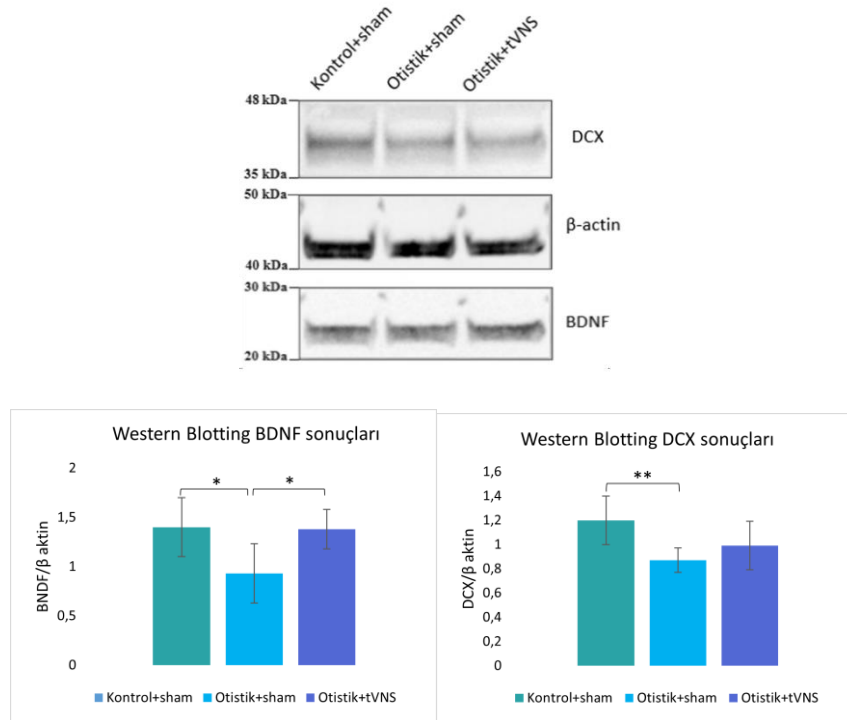
Şekil 4.14. AKTİF CASP-3 antikoruyla işaretli prefrontal kortkes immünreaktivite analiz sonuçları

4.3. Western Blotting Analiz Sonuçları

Maternal VPA maruziyeti sonrası doğan erkek yavrularda BDNF ve DCX protein miktarlarında azalma tespit edildi. Otistik+sham grubun BDNF/ β aktin protein miktarlarının kontrol+sham ve otistik+tVNS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu saptandı ($p<0,05$). Ek olarak, otistik+sham grubunun DCX/ β aktin protein miktarının kontrol+sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,01$). Otistik+sham grubunun, otistik+tVNS grubuna göre DCX/ β aktin protein miktarı azalmıştı fakat istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). tVNS sonrası BDNF ve DCX protein miktarlarında artış olduğu görüldü. Otistik+tVNS grubu ile kontrol+sham grubu arasında hem BDNF/ β aktin protein miktarları hem de DCX/ β aktin protein miktarının bakımından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$), (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.15).

Çizelge 4.17. BDNF ve DCX protein miktarlarının western blotting analiz sonuçları

	Kontrol+sham Ort $\pm$ sh	Otistik+sham Ort $\pm$ sh	Otistik+tVNS Ort $\pm$ sh	p
BDNF	1,40 $\pm$ 1,3	0,93 $\pm$ 1,3	1,38 $\pm$ 0,2	0,013
DCX	1,2 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,8	0,99 $\pm$ 0,5	0,007



BDNF/ β aktin ve DCX/ β aktin miktarları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.

Şekil 4.15. Western blotting analiz sonuçları

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, ilk kez maternal VPA maruziyeti ile oluşturulan otizm modelinde transauriküler vagus sinir stimülasyonunun otistik benzeri davranışlar ve nöronal süreçler üzerinde terapötik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Maternal VPA'ya maruziyeti sonrası doğan yavrularda, azalan sosyal etkileşim, artan sosyal geri çekilme ve artan anksiyete gibi davranışsal değişiklikler görüldü. Prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala bölgelerinin nöron morfolojisinde bozulma, nöron sayısında azalma ve apoptotik süreçlerde artışa sebep oldu. BDNF ve DCX ekspresyonunu azalttı, aktif CASP-3 aktivitesini arttırdı. Maternal VPA maruziyeti sonrası 3 hafta boyunca haftada 2 kez tVNS uygulaması, sosyal etkileşim düzeylerini arttırdı, sosyal geri çekilmeyi ve anksiyeteyi azalttı. Ek olarak, hücre yoğunluğunda artış ve hücre morfolojisinde olumlu etkiye sebep oldu. BDNF ve DCX ekspresyonunu arttırdı ve aktif CASP-3 aktivitesini azalttı.

Otizm Spektrum Bozukluğu erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 4 kat daha fazla görülmektedir. Maternal VPA maruziyeti sonrası doğan kemirgen yavrularında otizm benzeri davranışlara yol açmakta ve yaygın olarak OSB çalışmaları için kullanılmaktadır [5,46,55,79,81,113]. Özellikle embriyonik 11,5-12,5 günleri sırasında yani nöral tüpün kapanma döneminde uygulanan VPA'nın embriyonik nöronal süreçleri bozarak OSB'ye neden olduğu düşünülmektedir [114,115,116]. Bu çalışmada, erkek cinsiyette daha fazla görüldüğü için erkek fareler kullandık ve otizm modeli oluşturmak için gebelikte 600 mg/kg VPA uyguladık [105]. Fare ve insan yaş hesaplamaları çalışmalarında, 8-12 haftalık fareler (ortalama 70 günlük) yetişkinlik döneminde kabul edilmektedir [117]. Bu çalışmada, C57BL/6 fare türü kullanıldı ve deneyler 8-12 haftalar arası yapılarak 88. günlerinde tamamlandı. Bu yüzden verilerimiz yetişkin dönem verilerini yansıtmaktadır.

Otizm Spektrum Bozukluğunda sosyal etkileşimde ve iletişimde bozulma görülmektedir [118]. Kemirgen çalışmalarında sosyal etkileşimi incelemek için sıklıkla üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi kullanılmaktadır. Maternal VPA maruziyeti sonrası doğan erkek yavrularda sosyal etkileşimin azaldığı, yabancı farenin bulunduğu odada daha az kaldığı, tanıdık fareyi daha fazla tercih ettiği, sosyallik ve sosyal yenilik indekslerinin azaldığı yani sosyalleşme parametrelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğunu bildirilmektedir [119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129]. Bu çalışmada, VPA'lı erkek fare gruplarında sosyal indeksleri ve sosyal yenilik indeksleri düşük bulundu. tVNS uygulaması

sonrası erkek farelerde sosyal indeks ve sosyal yenilik indeks puanları anlamlı derecede arttığı görüldü.

Çalışmamıza sosyal anksiyeteyi incelemek için aynalı oda testi dahil ettik. Aynalı oda testinde, aynalı odada ve ışıklı alanlarda daha az kalma durumu hem sosyallik eğilimlerini hem de sosyal anksiyete düzeylerini değerlendirmek için kullanılabilir [130]. Otizm modeli geliştirilen kemirgen çalışmalarında aynalı odaya girişte gecikme, aynalı odada kalma süresinde ve merkez ayna oranında azalma olduğu belirtilmiştir [106,131]. Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak VPA'lı erkek fare gruplarında 8. ve 12. haftalarında, sosyallikte azalma ve sosyal anksiyete düzeylerinde arttı, merkez ayna oranı, aynalı odada kalma süresi azaldı. tVNS uygulaması sonrası merkez ayna oranı ve aynalı odada kalma sürelerinin arttığı görüldü.

OSB'li bireylerde olağandışı korku ve anksiyete benzeri davranışlar yaygın olarak görülür [118,132,133]. Maternal VPA maruziyeti sonrası oluşturulan otizm modelinde yükseltilmiş artı labirenti testinde anksiyöz davranışlarda artış, açık kollarda daha az kalma eğilimi [119,120,121,124,126,128,132,134,135], ek olarak, açık alan testinde, merkez alanda kalma süresinin azaldığı bildirilmektedir [125,127,128,129,132,135]. Bu çalışmada literatüre paralel olarak, VPA uygulanan grupta anksiyöz davranışların arttığı, açık kolda kalma yüzdelерinin ve açık kola giriş sayılarının azaldığı ve merkez alanlarda daha az süre kaldığı bulundu. tVNS uygulaması açık kolda kalma yüzdelерini, giriş sayılarını arttığı ve merkez alanda kalma süresini arttırdığı görüldü. Anksiyöz davranışlar tVNS sonrası azalmıştı.

Sosyal beyin alanı olarak adlandırılan amigdala, PFC, fusiform girus ve oksipital ve temporal alanlar, ASA, orbito-frontal alan gibi beyin bölgeleri sosyal iletişim ve etkileşimde oldukça önemlidir. Sosyal algıda inferior occipital girus, superior temporal sulcus ve girus ve çevre yapıları yüz ifadelerini okuma ve işlemede rol alırken, mPFC özellikle zihinselleştirmede rol almaktadır. Amigdala orbito-frontal korteks, ASA ve oksipital ve temporal alanlar sosyal ipuçlarını değerlendirerek karar ve davranışta rol oynar. Amigdala'nın korkulu yüz ifadelerini tanıma ve karşı tepki davranışı gibi süreçlerde hem oksipital alanlarla (görsel) hem de PFC (bilişsel) ile projeksiyonları bulunur [111,112]. Amigdala ve hipokampus duygu işleme sürecinde temel yapılardır. Amigdala aktivasyonunun, uzun süreli belleğin konsolidasyonunu etkilediği, duygusal uyarıların kodlanması sırasında amigdalanın aktivasyon derecesi, sonraki hatırlama ile büyük ölçüde ilişkilidir. Nöromodülatör sistemlerin aktivasyonu ve bilgilerin işlenmesinde yer alan beyin

bölgelerine olan projeksiyonları, duygusal olarak önemli deneyimlerin hatırlanmasını sağlamada kilit bir rol oynar [136]. OSB'li bireylerde tüm bu limbik sistem yapılarında anormal işlevler bildirilmektedir.

OSB'de sıklıkla duygu ve motivasyonda görevli olan amigdala ve fonksiyonundaki değişikliklere işaret edilmekte, kaygı ve endişe semptomları için odak gösterilmektedir. Çünkü kaygının artması ile sosyal iletişim arasında ters korelasyon bulunur [137]. OSB'li bireylerin, duygusal yüz ifadeleri işleme süreçlerinde bozulma dikkat çekmekte, kişilerin yüz ifadelerini tanımlama ve hatırlamada daha düşük puanlar aldıkları belirtilerek [138] sağ amigdala, sağ inferior frontal girusta aktivite azalması bildirilmektedir [139]. Ölüm sonrası yapılan insan çalışmalarında yetişkin OSB'li bireylerin amigdala nöron sayısında azalma raporlanmıştır [140,141]. Ek olarak, maternal VPA maruziyeti sonrası amigdalada piknotik nöronların oldukça fazla olduğu, nöron ölümü ve gliozise yol açtığı [142] ve bazolateral amigdala kalınlığında azalma [143] bildirilmiştir. Amigdala hücre yoğunluğundaki farklılıklar tüm bu süreçleri etkileyebilir [62].

Sosyal etkileşimde amigdala ile PFC arasındaki bağlantı dikkat çekicidir [144,145]. PFC'deki anomaliliklerin OSB'de davranışsal ve sosyal eksiklikler ilişkili olması şaşırtıcı değildir [146]. Nörogörüntüleme çalışmalarında, OSB'li bireylerde ASA, mPFC gibi alanlarda aktivitede azalma olduğu raporlanmıştır [111,112]. OSB'li bireylerde ASA bölgesinde aktivite azalması ile otistik semptomlarda artış arasında korelasyon bildirilmiştir [147]. Prefrontal kortekste nöronların boyut ve büyüklüklerinin heterojenlik gösterdiği ve hücreler arası boşluğun kontrole göre daha fazla olduğu bildirilmiştir [146]. Maternal VPA maruziyeti sonrası doğan yavrularda PFC'deki nöronların [148] dentritik dallanmasını ve dentdrit uzunluğunun azaldığı ek olarak PLA'nın kalınlığının azaldığı [143] bildirilmiştir.

Hipokampus, amigdala bağlantısı ve sosyal beyindeki işlevlere katılımı nedeniyle OSB'de sıklıkla incelenmektedir [149]. Hipokampus CA1 nöronları ile nuc. accumbens projeksiyonları sosyal tanıma ve hafızada primer görevli yapılardan biridir [125]. OSB'li 2 bireyin vaka sunumunda, CA1 bölgesinde dentritik dallanmada azalma bildirilmiştir [150]. Embriyonik dönemdeki VPA maruziyeti sonrası kortekste ve hipokampüste nöron sağ kalımını ve nöron gelişimini olumsuz etkilemekte ve hücrelerin ortalama canlı nöron sayısında önemli bir azalma ve daha koyu lekeli dejenere piramidal nöronlara sebep olmakta, piramidal nöron tabakasının kalınlığını azaltmakta, hücre yerleşimini bozmakta, dentritik

dallanma ve dendrit uzunluğunu azaltmakta, apoptotik hücrelerde artışa yol açtığı bildirilmektedir [64,119,125,126,129,143,146,151,152].

Otizm Spektrum bozukluğunun nedeni tam olarak bilinmese de çeşitli psikiyatrik hastalıklarda gözlemlenen apoptotik bozulmalar OSB’de de dikkat çekmektedir [67]. OSB’de sıklıkla nöroinflamasyona vurgu yapılmaktadır. Hatta OSB’de görülen davranış değişiklikleriyle değişen bağışıklık sistemi arasındaki bağlantıdan söz edilerek büyüme faktörlerinin ve nörogenezin kesintiye uğramış üretimi ve sonucunda da klinik tablo karşımıza çıkmakta yönünde görüşler bulunmaktadır [153]. Yüksek aktif CASP-3 OSB’li çocuklarda apoptozun arttığına işaret etmektedir [20]. Maternal VPA maruziyeti, apoptotik hücre ölümünü indüklemekte ve AKTİF CASP3 immünreaktivitesini arttırmaktadır [77,107,125,127,129,154]. Özellikle apoptotik düzensizlik nöron miktarında azalmaya sebep olarak sinir sistemi gelişimde olumsuzluklara yol açmaktadır [77]. Bizim çalışmamızda literatüre paralel olarak, VPA’lı grupta 3 bölgede de hücre yoğunluğunda azalma olduğu (hipokampüste, CA1 ve CA3 bölgesi piramidal nöron yoğunluğunda azalma görüldü. DG subgranüler tabakasının kalınlığının azaldığı saptandı. Amigdala alt çekirdekleri olan LA, BA (bazomedial ve bazolateral), SA ve MA bölgelerinde hücre yoğunluğunda azalma tespit edildi. Prefronral korteks bölgeleri olan ILA, PLA ve ASA’da anlamlı derece hücre yoğunluğunda azalma ek olarak hücrelerde küçülme ve koyu nöron benzeri bir görüntü olduğu tespit edildi ve AKTİF CASP-3 aktivitesinde VPA’lı grupta artış olduğu bulundu. tVNS uygulaması sonrasında ise hücre yoğunluğunda artış (piramidal hücre yoğunluğunda artış ve DG subgranüler tabakasının kalınlığında artış, amigdala alt çekirdeklerinde hücre yoğunluğunda artış bulundu ve PFC’de de hücre yoğunluğunda artış ek olarak koyu nöron görünümlü nöronlar azalma) ve AKTİF CASP3 aktivitesinde azalma olduğu görüldü. Bulgularımız, maternal VPA maruziyeti sonrası doğan erkek farelerin, önceki raporlarla bağlantılı olarak, amigdala, prefrontal korteks ve hipokampusünde nöronların olgunlaşma sürecine işaret etmekte ve anormal nöral devre oluşabileceğini göstermektedir.

BDNF doğum öncesi ve doğum sonrası beyin gelişimine katkıda bulunarak nörogelişim sırasında hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı ve migrasyonunda önemli bir düzenleyici işlevi vardır [66,67,68,69]. BDNF uzun süreli hafızada, yetişkin nörogenezinde ve sinaptik plastisitede önemlidir [155]. OSB çalışmalarında BDNF miktarı farklılık göstermekte, artması [17,156,157], azalması [67,73,126,129,158,159,160,161] ya da kontrollerle arasında fark olmaması [162] gibi literatürde oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır ve

literatürde bilgiler tutarlı değildir. DCX, mikrotübül bağlayıcı fosfoproteindir ve nöral göç sırasında nöroblastlar tarafında eksprese edildiği bildirilmiştir. Nöronal yapısal göç, dentritik dallanmalarda etkili olduğu ifade edilmektedir. Olgunlaşmamış nöronları işaretlemek için sıklıkla kullanılır [141]. Maternal VPA maruziyeti sonrası hipokampus, PFC, serebellum ve striatumda DCX miktarında ve ekspresyonunda azalma bildirilmektedir [73,122,126,159,160,161]. VPA, hücre yoğunluğunu baskılayarak nöronal gelişimi değiştirmesi sinaps oluşumu ve hücre morfolojiyi değiştirmesi nedeniyle BDNF ve DCX proteinlerinin düzeylerini değiştirerek OSB’de görülen semptomlara aracılık ediyor olabilir. Bu durum, OSB’de çeşitli beyin fonksiyonlarında bozulmaya işaret eder ve anormal kortikal bağlantıları gösterir [18,153,155,163,164]. Çalışmamızda nöronal gelişim ve plastisitede rol oynadığı bilinen belirteçlerin değişiklikleri özellikle ilgi çekicidir. Nörogelişim sürecinde primer görev alan proteinlerdeki değişiklikler sonucu OSB gibi nörogelişimsel hastalıklardaki kusurla tutarlıdır. Bu çalışmanın bulguları da literatüre benzer katkı sağladı ve VPA uygulaması sonrası hem BDNF hem de DCX azaldı. Otistik gruba uygulanan tVNS BDNF ve DCX ekspresyonunu arttırdı.

VNS'nin çıkan yolları stimüle ederek nöral plastisiteyi güçlendirmesi ek olarak inen yolları stimüle ederek sakinleştirici parasempatik girdi sağlamadaki ikili etkisiyle aslında günümüzdeki farmakolojik tedavilerde olmayan benzersiz faydalar sağladığı görülmektedir [93]. Sağlıklı bireylerde yapılan tVNS uygulaması sonrası duygusal [165], öfke tanınmasının [166], görsel dikkatin [167] ve yüz için gelişmiş duygu tanımanın [168] geliştiği bildirildi. Ek olarak, tVNS'nin korkuyla güçlendirilmiş irkilme tepkilerinin ve bilişsel risk değerlendirmelerinin engellenmesini kolaylaştırdığını [169] ve koşullu korkuyu azalttığı [170], ruh hali mücadelesinden sonra etkiyi iyileştirmeye [171] yardımcı olabileceği bildirildi. Kemirgenlerde VNS uygulaması sonrası anksiyete düzeylerinin azaldığını raporlandı [172]. Depresyon tanılı hastalarda tVNS uygulamasının yüz ifadelerinin tanınmasında pozitif etki sağladığı [173] ve amigdala ve PFC bağlantısını modüle ederek duygudurum üzerine olumlu etkileri olduğu [99] bildirildi. Ek olarak hafıza ve bilişsel esnekliği arttığı [103,174] bildirildi.

VNS epilepsi hastalarında nöbetleri kontrol altına alabilmek için kullanılan bir tedavi yöntemidir [93,175]. Epilepsi eşlik eden OSB vakalarında VNS uygulaması nöbet sıklığını azalttığı ve otistik benzeri davranış üzerine olumlu yanıtlar getirdiği bildirilmiştir [12,98,176]. Epilepsi tanılı ama OSB tanısı olmayan ve OSB ve epilepsi tanılı hastalarda (20 yaş ve altı) VNS uygulaması sonrası, her iki grupta da nöbet sayılarının azaldığı ve yaşam

kalitelerinde artış olduğu bildirilmiştir [94]. Nöbetlerin OSB'ye sıklıkla (%30) eşlik ettiğini göz önünde bulundurarak hem Asperger sendromu hem de bitemporal epilepsi tanısı almış 23 yaşındaki bir erkek hastaya VNS uygulaması yapan bir çalışmada 6 ay süresince hem nöbet sıklığında azalma olduğu hem de davranış değişikliklerine yol açtığı bildirildi [177]. VNS'nin sadece epilepsili OSB hastalarında nöbet sıklığını azaltmak için değil OSB'nin temel semptomları olan sosyal iletişimde bozulma ve anksiyete gerilemesine tVNS uygulaması etkili olabilir [92,100,178]. Epilepsili OSB hastalarında VNS etkinliğinin uzun süreli olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır [179]. Aslında bu tutarsızlık spektrumun oldukça geniş bir yelpazeyi içermesi (hastalığın erken başlama örüntüsü, semptomların şiddeti vb.) ve yaş grubu ve cinsiyet dağılımını içeriyor olması ve küçük ya da büyük örneklemeleri içeriyor olması olabilir.

OSB gibi çeşitli nörogelişimsel bozukluklarda amigdala, PFC ve hipokampüse sıklıkla vurgu yapılmakta ve olgunlaşmamış piknotik nöronlara işaret edilmekte, benzer şekilde plastisite süreçlerinde aksaklıklar ve nöroplastisitede görevli proteinlerin miktarlarında farklılıklar raporlanmaktadır. Ancak bu bölgelerdeki disfonksiyonun hastalığın tam olarak hangi zamanında ortaya çıktığı ya da hastalıklardaki kesin katkısı tam olarak anlaşılamamıştır. Gelecekteki çalışmaların, nöroplastisite süreçlerinde bu olgunlaşmamış nöronların rollerini ve belki de bir odak olarak nasıl kullanılabileceğini daha fazla aydınlatmak için kökenini, zamanlamasını, plastisitesini ve nöronal süreçlerini ele alması gerekecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Valproik asit 600 mg/kg (oral), kontrol ile karşılaştırıldığında, farelerin OSB benzeri davranışlar göstermesine yol açtı. VPA'lı grubun sosyallik indeksleri ve sosyallik oranları düşüktü. Anksiyete seviyeleri beklenildiği gibi sham gruba göre yüksekti. Prefrontal korteks, hipokampus ve amigdalada hücre sayısında azalma ve apoptotik hücre sayısında artış olduğu saptandı. BDNF ve DCX ekspresyonunun azaldığı, aktif CASP-3 aktivitesinin arttığı görüldü. Toplam BDNF protein miktarında tVNS sonrası anlamlı artış görülürken DCX toplam protein miktarında artış vardı fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. 3 hafta boyunca 6 kez tVNS uygulaması erkek farelerde OSB benzeri davranışları sağlıklı grupların davranış değerlerine yaklaştığı belirlendi. Hem hücre yoğunluğunda artışa hem de BDNF ve DCX ekspresyon miktarında artışa sebep oldu.

Literatürde C57BL/6 farelerde maternal VPA maruziyeti ile otizm modeli oluşturularak ilk kez tVNS uygulaması yapılan bu ön çalışmada, OSB tedavisi için umut vaat edici sonuçlar elde edildi. İnsanda VNS uygulaması, 20 haftaya kadar normal tedavi prosedürü olarak önerilmektedir [180]. Bu çalışmada hayvanlara 3 hafta boyunca haftada 2 kez stimülasyon uygulandı. Uzun dönem etkilerini belirlemek için daha uzun süreli stimülasyon uygulamaları gerekli olabilir. Ek olarak, bu çalışmada BDNF ve DCX proteinleri, hemisferde toplam protein analizi olarak incelendi. Gelecek çalışmalarda sadece ilgili alanların bölgesel protein miktarlarının incelenmesi faydalı olabilir. Transauricular vagal sinir stimülasyonu, Otizm Spektrum Bozukluğu için destekleyici bir tedavi alternatifi olabilir.

KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th Edition (DSM-V). Washington DC: American Psychiatric Press, 165-169.
2. Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Aylward, E. H., Echelard, D., Artru, A. A., Maravilla, K. R., Giedd, J. N., Munson, J., Dawson, G., and Dager, S. R. (2002). Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, 59(2), 184–192. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.2.184>
3. Chaliha, D., Albrecht, M., Vaccarezza, M., Takechi, R., Lam, V., Al-Salami, H., and Mamo, J. (2020). A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental neuroscience*, 42(1), 12–48. <https://doi.org/10.1159/000509109>
4. Maenner, M. J., Shaw, K. A., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Esler, A., Furnier, S. M., Hallas, L., Hall-Lande, J., Hudson, A., Hughes, M. M., Patrick, M., Pierce, K., Poynter, J. N., Salinas, A., Shenouda, J., Vehorn, A., Warren, Z., Constantino, J. N., DiRienzo, M., Fitzgerald R.T., Grzybowski A, Spivey MH, Pettygrove S, Zahorodny W., Ali A., Andrews J.G., Baroud T., Gutierrez J., Hewitt A., Lee L.C., Lopez M., Mancilla K.C., McArthur D., Schwenk Y.D., Washington A, Williams S, Cogswell, M. E. (2021). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. Morbidity and mortality weekly report. *Surveillance summaries* (Washington, D.C.: 2002), 70(11), 1–16. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7011a1>
5. Taleb, A., Lin, W., Xu, X., Zhang, G., Zhou, Q. G., Naveed, M., Meng, F., Fukunaga, K., and Han, F. (2021). Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 137, 111322. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111322>
6. Mabunga, D. F., Gonzales, E. L., Kim, J. W., Kim, K. C., and Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental neurobiology*, 24(4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
7. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., and Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of neurology*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
8. Schneider, T., and Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
9. Klusek, J., Martin, G. E., and Losh, M. (2013). Physiological arousal in autism and fragile X syndrome: group comparisons and links with pragmatic language. *American journal on intellectual and developmental disabilities*, 118(6), 475–495. <https://doi.org/10.1352/1944.7558-118.6.475>
10. Kushki, A., Brian, J., Dupuis, A., and Anagnostou, E. (2014). Functional autonomic nervous system profile in children with autism spectrum disorder. *Molecular autism*, 5,39. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-39>
11. Matsushima K., Matsubayashi J., Toichi M., Funabiki Y., Kato T., Awaya T., Kato T. (2016). Unusual sensory features are related to resting-state cardiac vagus nerve activity in autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 25, 37-46.
12. van Hoorn, A., Carpenter, T., Oak, K., Laugharne, R., Ring, H., and Shankar, R. (2019). Neuromodulation of autism spectrum disorders using vagal nerve stimulation. *Journal*

- of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 63, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.042>
13. Kakinuma Y. (2021). Significance of vagus nerve function in terms of pathogenesis of psychosocial disorders. *Neurochemistry international*, 143, 104934. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104934>
 14. Dell'Osso, L., Massoni, L., Battaglini, S., Cremone, I. M., Carmassi, C., and Carpita, B. (2022). Biological correlates of altered circadian rhythms, autonomic functions and sleep problems in autism spectrum disorder. *Annals of general psychiatry*, 21(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12991-022-00390-6>
 15. Schiltz, H. K., Fenning, R. M., Erath, S. A., and Baker, J. K. (2022). Parasympathetic functioning and sleep problems in children with autism spectrum disorder. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*, 10.1002/aur.2816. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/aur.2816>
 16. Miyazaki, K., Narita, N., and Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 23(2-3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>
 17. Saghaazadeh, A., and Rezaei, N. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Autism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of autism and developmental disorders*, 47(4), 1018–1029. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-3024-x>
 18. Kasarpalkar, N. J., Kothari, S. T., and Dave, U. P. (2014). Brain-Derived Neurotrophic Factor in children with Autism Spectrum Disorder. *Annals of neurosciences*, 21(4), 129–133. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210403>
 19. Wall, D. P., Esteban, F. J., Deluca, T. F., Huyck, M., Monaghan, T., Velez de Mendizabal, N., Goñi, J., and Kohane, I. S. (2009). Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics*, 93(2), 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.09.015>
 20. Ayaydin, H., Kirmit, A., Çelik, H., Akaltun, İ., Koyuncu, İ., and Bilgen Ulgar, Ş. (2020). High Serum Levels of Serum 100 Beta Protein, Neuron-specific Enolase, Tau, Active Caspase-3, M30 and M65 in Children with Autism Spectrum Disorders. *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 18(2), 270–278. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.2.270>
 21. He, W., Wang, X., Shi, H., Shang, H., Li, L., Jing, X., and Zhu, B. (2012). Auricular acupuncture and vagal regulation. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2012, 786839. <https://doi.org/10.1155/2012/786839>
 22. Yap, J., Keatch, C., Lambert, E., Woods, W., Stoddart, P. R., and Kameneva, T. (2020). Critical Review of Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation: Challenges for Translation to Clinical Practice. *Frontiers in neuroscience*, 14, 284. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00284>
 23. Bleuler E. (1950). Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias. New York: International Universities Press.
 24. Evans B. (2013). How autism became autism: The radical transformation of a santral concept of child development in Britain. *History of the human sciences*, 26(3), 3–31. <https://doi.org/10.1177/0952695113484320>
 25. Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217–250.
 26. Folstein, S. E. ve Rosen-Sheidley, B. (2001). Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature reviews. Genetics*, 2(12), 943–955. <https://doi.org/10.1038/35103559>

27. Tsai L. Y. (2014). Impact of DSM-5 on epidemiology of Autism Spectrum Disorder. *Research Autism Spectrum Disorder*, 8(11):1454-1470, doi: 10.1016/j.rasd.2014.07.016.
28. APA (1980). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (3rd Edition) (DSM-III). American Psychiatric Association, *American Psychiatric Press*. Washington DC.
29. APA (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th Edition) (DSM-IV). Amerikan Psychiatric Association. *American Psychiatric Press*, Washington DC.
30. Sahin, M., and Sur, M. (2015). Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6263), 10.1126/science.aab3897 aab3897. <https://doi.org/10.1126/science.aab3897>
31. Courchesne, E., Pierce, K., Schumann, C. M., Redcay, E., Buckwalter, J. A., Kennedy, D. P., and Morgan, J. (2007). Mapping early brain development in autism. *Neuron*, 56(2), 399–413. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.016>
32. Posey, D. J., Erickson, C. A., and McDougle, C. J. (2008). Developing drugs for core social and communication impairment in autism. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America*, 17(4), 787–ix. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2008.06.010>
33. Ey, E., Leblond, C. S., and Bourgeron, T. (2011). Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, 4(1), 5–16. <https://doi.org/10.1002/aur.175>
34. Chaliha, D., Albrecht, M., Vaccarezza, M., Takechi, R., Lam, V., Al-Salami, H., and Mamo, J. (2020). A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental neuroscience*, 42(1), 12–48. <https://doi.org/10.1159/000509109>
35. Lotter, V. (1966). Epidemiology of otistik conditions in young children. *Soc Psychiatry* 1, 124–135 <https://doi.org/10.1007/BF00584048>
36. Kogan, M. D., Blumberg, S. J., Schieve, L. A., Boyle, C. A., Perrin, J. M., Ghandour, R. M., Singh, G. K., Strickland, B. B., Trevathan, E., and van Dyck, P. C. (2009). Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics*, 124(5), 1395–1403. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1522>
37. Türkiye Büyük Millet Meclisi Araştırma Komisyonu Raporu. www.tbmm.gov.tr. 2020 -03- Sağlık Bakanlığı tarafından Komisyona gönderilen 19.07.2019 tarihli ve 29542975-045.99- E.6 sayılı yazı. (www.tbmm.gov.tr/sirasayi/donem27/yil01/ss200.pdf)
38. Pellicano E. (2012). The development of executive function in autism. *Autism research and treatment*, 2012, 146132. <https://doi.org/10.1155/2012/146132>
39. Ganz M. L. (2007). The lifetime distribution of the incremental societal costs of autism. *Archives of pediatrics and adolescent medicine*, 161(4), 343–349. <https://doi.org/10.1001/archpedi.161.4.343>
40. Rogge, N., and Janssen, J. (2019). The Economic Costs of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Journal of autism and developmental disorders*, 49(7), 2873–2900. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-04014-z>
41. Leslie, D. L., and Martin, A. (2007). Health care expenditures associated with autism spectrum disorders. *Archives of pediatrics and adolescent medicine*, 161(4), 350–355. <https://doi.org/10.1001/archpedi.161.4.350>
42. Zhao, Y., Luo, Y., Zhang, R., and Zheng, X. (2023). Direct and indirect costs for families of children with autism spectrum disorder in China. *Autism : the international journal of research and practice*, 13623613231158862. Advance online publication. <https://doi.org/10.1177/13623613231158862>
43. Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., and Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, behavior, and immunity*, 25(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>

44. Volk, H. E., Ames, J. L., Chen, A., Fallin, M. D., Hertz-Picciotto, I., Halladay, A., Hirtz, D., Lavin, A., Ritz, B., Zoeller, T., and Swanson, M. (2022). *Considering Toxic Chemicals in the Etiology of Autism. Pediatrics*, 149(1), e2021053012. <https://doi.org/10.1542/peds.2021-053012>
45. Wöhr, M., and Scattoni, M. L. (2013). Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments. *Behavioural brain research*, 251, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.047>
46. Nicolini, C., and Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental neurology*, 299 (Pt A), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
47. Caruso, A., Ricceri, L., and Scattoni, M. L. (2020). Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 116, 31–43.
48. Pastoreka M., Drobnáa D. ve Celecab P. (2022). “Could neutrophil extracellular traps drive the development of autism?” *Medical Hypotheses*, Vol. 167, 110929, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2022.110929>
49. Modabbernia, A., Velthorst, E., and Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular autism*, 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
50. Buxbaum J. D. (2009). Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(1), 35–43. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.1/jdbuxbaum>
51. Depino A. M. (2013). Peripheral and santral inflammation in autism spectrum disorders. *Molecular and cellular neurosciences*, 53, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.003>
52. Gadad, B. S., Hewitson, L., Young, K. A., and German, D. C. (2013). Neuropathology and animal models of autism: genetic and environmental factors. *Autism research and treatment*, 2013, 731935. <https://doi.org/10.1155/2013/731935>
53. Taylor, M. J., Rosenqvist, M. A., Larsson, H., Gillberg, C., D'Onofrio, B. M., Lichtenstein, P., and Lundström, S. (2020). Etiology of Autism Spectrum Disorders and Autistic Traits Over Time. *JAMA psychiatry*, 77(9), 936–943. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.0680>
54. Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., and Rodier, P. M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and teratology*, 22(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(99)00083-5)
55. Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005 Apr-May;23(2-3):189-99. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001. PMID: 15749245.
56. Foley, A. G., Gannon, S., Rombach-Mullan, N., Prendergast, A., Barry, C., Cassidy, A. W., and Regan, C. M. (2012). Class I histone deacetylase inhibition ameliorates social cognition and cell adhesion molecule plasticity deficits in a rodent model of autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*, 63(4), 750–760. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.042>
57. Chomiak, T., Turner, N., ve Hu, B. (2013). What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. *Pathology research international*, 2013, 712758. <https://doi.org/10.1155/2013/712758>
58. Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., and Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain : a journal of neurology*, 121 (Pt 5), 889–905. <https://doi.org/10.1093/brain/121.5.889>

59. Bauman, M., and Kemper, T. L. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, 35(6), 866–874. <https://doi.org/10.1212/wnl.35.6.866>
60. Bauman M. L. (1996). Brief report: neuroanatomic observations of the brain in pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 26(2), 199–203. <https://doi.org/10.1007/BF02172012>
61. Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J. D., and Hof, P. R. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta neuropathologica*, 134(4), 537–566. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>
62. Bauman, M. L., and Kemper, T. L. (Eds.). (2005). *The neurobiology of autism*, 2nd ed. *Johns Hopkins University Press*.
63. Blatt G. J. (2012). The neuropathology of autism. *Scientifica*, 2012, 703675. <https://doi.org/10.6064/2012/703675>
64. Hussein, A. M., Mahmoud, S. A., Elazab, K. M., Abouelnaga, A. F., Abass, M., Mosa, A. A. H., Hussein, M. A. M., and Elsayed, M. E. G. (2023). Possible Mechanisms of the Neuroprotective Actions of Date Palm Fruits Aqueous Extracts against Valproic Acid-Induced Autism in Rats. *Current issues in molecular biology*, 45(2), 1627–1643. <https://doi.org/10.3390/cimb45020105>
65. Kemper, T. L., and Bauman, M. (1998). Neuropathology of infantile autism. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57(7), 645–652. <https://doi.org/10.1097/00005072-199807000-00001>
66. Binder, D. K., and Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* (Chur, Switzerland), 22(3), 123–131. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
67. Sheikh, A. M., Malik, M., Wen, G., Chauhan, A., Chauhan, V., Gong, C. X., Liu, F., Brown, W. T., and Li, X. (2010). BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of otistik subjects. *Journal of neuroscience research*, 88(12), 2641–2647. <https://doi.org/10.1002/jnr.22416>
68. Furmaga, H., Carreno, F. R., and Frazer, A. (2012). Vagal nerve stimulation rapidly activates brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB in rat brain. *PloS one*, 7(5), e34844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034844>
69. Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., and Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7777. <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>
70. Phillips, H. S., Hains, J. M., Laramée, G. R., Rosenthal, A., and Winslow, J. W. (1990). Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* (New York, N.Y.), 250(4978), 290–294. <https://doi.org/10.1126/science.1688328>
71. Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., and Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80777-1)
72. Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., and Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80778-3)
73. Lee, S. M., Kim, B. K., Kim, T. W., Ji, E. S., and Choi, H. H. (2016). Music application alleviates short-term memory impairments through increasing cell proliferation in the

- hippocampus of valproic acid-induced autistic rat pups. *Journal of exercise rehabilitation*, 12(3), 148–155. <https://doi.org/10.12965/jer.1632638.319>
74. Ertürk, A., Wang, Y., and Sheng, M. (2014). Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(5), 1672–1688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3121-13.2014>
 75. García-Domínguez, I., Suárez-Pereira, I., Santiago, M., Pérez-Villegas, E. M., Bravo, L., López-Martín, C., Roca-Ceballos, M. A., García-Revilla, J., Espinosa-Oliva, A. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Joseph, B., Berrocoso, E., Armengol, J. Á., Venero, J. L., Ruiz, R., and de Pablos, R. M. (2021). Selective deletion of caspase-3 gene in the dopaminergic system exhibits autistic-like behaviour. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 104, 110030. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110030>
 76. El-Ansary, A. K., Ben Bacha, A. G., and Al-Ayadhi, L. Y. (2011). Proinflammatory and proapoptotic markers in relation to mono and di-cations in plasma of autistic patients from Saudi Arabia. *Journal of neuroinflammation*, 8, 142. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-142>
 77. Habib, M. Z., Elnahas, E. M., Aboul-Ela, Y. M., Ebeid, M. A., Tarek, M., Sadek, D. R., Negm, E. A., Abdelhakam, D. A., and Aboul-Fotouh, S. (2023). Risperidone impedes glutamate excitotoxicity in a valproic acid rat model of autism: Role of ADAR2 in AMPA GluA2 RNA editing. *European journal of pharmacology*, 955, 175916. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175916>
 78. Johannessen, C. U., and Johannessen, S. I. (2003). Valproate: past, present, and future. *CNS drug reviews*, 9(2), 199–216. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x>
 79. Rouillet, F. I., Lai, J. K., and Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>
 80. Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., and Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
 81. Mehra, S., Ul Ahsan, A., Seth, E., ve Chopra, M. (2022). Critical Evaluation of Valproic Acid-Induced Rodent Models of Autism: Current and Future Perspectives. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 72(6), 1259–1273. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-02033-7>
 82. Moore, S. J., Turnpenney, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D. J., Montgomery, T., and Dean, J. C. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *Journal of medical genetics*, 37(7), 489–497. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.7.489>
 83. Hrabovska, S.V., Salyha, Y.T. (2016). Animal Models of Autism Spectrum Disorders and Behavioral Techniques of their Examination. *Neurophysiology* 48, 380–388 <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9613-2>
 84. Edalatmanesh, M. A., Nikfarjam, H., Vafaei, F., and Moghadas, M. (2013). Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain research*, 1526, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.06.024>
 85. Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Yang, S. I., Cheong, J. H., Shin, C. Y., and Ko, K. H. (2011). The critical period of valproate exposure to induce otistik symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicology letters*, 201(2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.018>
 86. Arıncı K., Elhan A. (2016). Anatomi 1. Cilt (6. Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri
 87. Howland R. H. (2014). Vagus Nerve Stimulation. *Current behavioral neuroscience reports*, 1(2), 64–73. <https://doi.org/10.1007/s40473-014-0010-5>

88. Peuker, E. T., and Filler, T. J. (2002). The nerve supply of the human auricle. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 15(1), 35–37. <https://doi.org/10.1002/ca.1089>
89. Butt, M. F., Albusoda, A., Farmer, A. D., and Aziz, Q. (2020). The anatomical basis for transcutaneous auricular vagus nerve stimulation. *Journal of anatomy*, 236(4), 588–611. <https://doi.org/10.1111/joa.13122>
90. Nemeroff, C. B., Mayberg, H. S., Kahl, S. E., McNamara, J., Frazer, A., Henry, T. R., George, M. S., Charney, D. S., and Brannan, S. K. (2006). VNS therapy in treatment-resistant depression: clinical evidence and putative neurobiological mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1345–1355. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301082>
91. Kaniusas, E., Kampusch, S., Tittgemeyer, M., Panetsos, F., Gines, R. F., Papa, M., Kiss, A., Podesser, B., Cassara, A. M., Tanghe, E., Samoudi, A. M., Tarnaud, T., Joseph, W., Marozas, V., Lukosevicius, A., Ištuk, N., Šarolić, A., Lechner, S., Klonowski, W., Varoneckas, G., ... Széles, J. C. (2019). Current Directions in the Auricular Vagus Nerve Stimulation I- A Physiological Perspective. *Frontiers in neuroscience*, 13, 854. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00854>
92. Colzato, L. S., Sellaro, R., and Beste, C. (2017). Darwin revisited: The vagus nerve is a causal element in controlling recognition of other's emotions. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 92, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.03.017>
93. Engineer, C. T., Hays, S. A., and 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. <https://doi.org/10.1186/s11689-017-9203-z>
94. Levy, M. L., Levy, K. M., Hoff, D., Amar, A. P., Park, M. S., Conklin, J. M., Baird, L., and Apuzzo, M. L. (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. <https://doi.org/10.3171/2010.3.PEDS09153>
95. Kreuzer, P. M., Landgrebe, M., Husser, O., Resch, M., Schecklmann, M., Geisreiter, F., Poepl, T. B., Prasser, S. J., Hajak, G., and Langguth, B. (2012). Transcutaneous vagus nerve stimulation: retrospective assessment of cardiac safety in a pilot study. *Frontiers in psychiatry*, 3, 70. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00070>
96. Zhang, Y., Huang, Y., Li, H., Yan, Z., Zhang, Y., Liu, X., Hou, X., Chen, W., Tu, Y., Hodges, S., Chen, H., Liu, B., and Kong, J. (2021). Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) for migraine: an fMRI study. *Regional anesthesia and pain medicine*, 46(2), 145–150. <https://doi.org/10.1136/rapm-2020-102088>
97. Baig, S. S., Kamarova, M., Ali, A., Su, L., Dawson, J., Redgrave, J. N., and Majid, A. (2022). Transcutaneous vagus nerve stimulation (tVNS) in stroke: the evidence, challenges and future directions. *Autonomic neuroscience : basic and clinical*, 237, 102909. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102909>
98. Wang, Z., Yuan, X., Zhang, Q., Wen, J., Cheng, T., Qin, X., Ji, T., Shu, X., Jiang, Y., Liao, J., Hao, H., Li, L., and Wu, Y. (2022). Effects of Stable Vagus Nerve Stimulation Efficacy on Otic Behaviors in Ten Pediatric Patients With Drug Resistant Epilepsy: An Observational Study. *Frontiers in pediatrics*, 10, 846301. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.846301>
99. Liu, C. H., Yang, M. H., Zhang, G. Z., Wang, X. X., Li, B., Li, M., Woelfer, M., Walter, M., and Wang, L. (2020). Neural networks and the anti-inflammatory effect of

- transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in depression. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01732-5>
100. Jin, Y., ve Kong, J. (2017). Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation: A Promising Method for Treatment of Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in neuroscience*, 10, 609. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00609>
 101. Burger, A. M., Verkuil, B., Van Diest, I., Van der Does, W., Thayer, J. F., and Brosschot, J. F. (2016). The effects of transcutaneous vagus nerve stimulation on conditioned fear extinction in humans. *Neurobiology of learning and memory*, 132, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.05.007>
 102. Shivaswamy T., Souza R. R., Engineer C. T., McIntyre C. T. (2022). “Vagus Nerve Stimulation as a Treatment for Fear and Anxiety in Individuals with Autism Spectrum Disorder”. *J Psychiatry Brain Sci.* 2022;7:e220007. <https://doi.org/10.20900/jpbs.20220007>
 103. Altidor, L. K., Bruner, M. M., Deslauriers, J. F., Garman, T. S., Ramirez, S., Dirr, E. W., Olczak, K. P., Maurer, A. P., Lamb, D. G., Otto, K. J., Burke, S. N., Bumanglag, A. V., Setlow, B., and Bizon, J. L. (2021). Acute vagus nerve stimulation enhances reversal learning in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 184, 107498. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107498>
 104. Redgrave, J., Day, D., Leung, H., Laud, P. J., Ali, A., Lindert, R., and Majid, A. (2018). Safety and tolerability of Transcutaneous Vagus Nerve stimulation in humans; a systematic review. *Brain stimulation*, 11(6), 1225–1238. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.08.010>
 105. Matsuo, K., Yabuki, Y., and Fukunaga, K. (2020). 5-aminolevulinic acid inhibits oxidative stress and ameliorates autistic-like behaviors in prenatal valproic acid-exposed rats. *Neuropharmacology*, 168, 107975. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107975>,
 106. Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., and Paylor, R. (2005). Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes, brain, and behavior*, 4(7), 420–430. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00123.x>
 107. Zahedi, E., Sadr, S. S., Sanaeierad, A., and Roghani, M. (2023). Valproate-induced murine autism spectrum disorder is associated with dysfunction of amigdala parvalbumin interneurons and downregulation of AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling. *Metabolic brain disease*, 38(6), 2093–2103. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01227-1>
 108. Zhang, N., Wang, S. T., and Yao, L. (2023). Inhalation of Cananga odorata essential oil relieves anxiety behaviors in autism-like rats via regulation of serotonin and dopamine metabolism. *Journal of integrative medicine*, 21(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2023.01.006>
 109. Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>)
 110. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
 111. Ashwin, C., Baron-Cohen, S., Wheelwright, S., O'Riordan, M., and Bullmore, E. T. (2007). Differential activation of the amigdala and the 'social brain' during fearful face-processing in Asperger Syndrome. *Neuropsychologia*, 45(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.04.014>
 112. Philip, R. C., Dauvermann, M. R., Whalley, H. C., Baynham, K., Lawrie, S. M., and Stanfield, A. C. (2012). A systematic review and meta-analysis of the fMRI investigation

- of autism spectrum disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(2), 901–942. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.008>
113. Patterson P. H. (2011). Modeling otistik features in animals. *Pediatric research*, 69(5 Pt 2), 34R–40R. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318212b80f>
 114. Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., and Croog, V. J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 11(2-3), 417–422. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(97\)80001-u](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(97)80001-u)
 115. Shepard, T. H., Muffley, L. A., and Smith, L. T. (1998). Ultrastructural study of mitochondria and their cristae in embryonic rats and primate (*N. nemistrina*). *The Anatomical record*, 252(3), 383–392. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199811\)252:3<383::AID-AR6>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199811)252:3<383::AID-AR6>3.0.CO;2-Z)
 116. Finnell, R. H., Gould, A., and Spiegelstein, O. (2003). Pathobiology and genetics of neural tube defects. *Epilepsia*, 44 Suppl 3, 14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.44.s3.5.x>
 117. Dutta, S., and Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life sciences*, 152, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
 118. Amaral, D. G., Bauman, M. D., and Schumann, C. M. (2003). The amigdala and autism: implications from non-human primate studies. *Genes, brain, and behavior*, 2(5), 295–302. <https://doi.org/10.1034/j.1601-183x.2003.00043.x>
 119. Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., and Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
 120. Mony, T. J., Lee, J. W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., and Lee, H. J. (2016). Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Otistik-like Behaviors in Rats. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 14(4), 338–344. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>
 121. Kim, J. W., Seung, H., Kwon, K. J., Ko, M. J., Lee, E. J., Oh, H. A., Choi, C. S., Kim, K. C., Gonzales, E. L., You, J. S., Choi, D. H., Lee, J., Han, S. H., Yang, S. M., Cheong, J. H., Shin, C. Y., and Bahn, G. H. (2014). Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PloS one*, 9(8), e104927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104927>
 122. Bertolino, B., Crupi, R., Impellizzeri, D., Bruschetta, G., Cordaro, M., Siracusa, R., Esposito, E., and Cuzzocrea, S. (2017). Beneficial Effects of Co-Ultramicronized Palmitoylethanolamide/Luteolin in a Mouse Model of Autism and in a Case Report of Autism. *CNS neuroscience and therapeutics*, 23(1), 87–98. <https://doi.org/10.1111/cns.12648>
 123. Chau, D. K., Choi, A. Y., Yang, W., Leung, W. N., and Chan, C. W. (2017). Downregulation of glutamatergic and GABAergic proteins in valproic acid associated social impairment during adolescence in mice. *Behavioural brain research*, 316, 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.003>
 124. Wu, H. F., Lu, T. Y., Chu, M. C., Chen, P. S., Lee, C. W., and Lin, H. C. (2020). Targeting the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorate the endocannabinoid-mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism. *Neuropharmacology*, 162, 107736. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107736>
 125. Lan, J., Hu, Y., Wang, X., Zheng, W., Liao, A., Wang, S., Li, Y., Wang, Y., Yang, F., and Chen, D. (2021). Abnormal spatiotemporal expression pattern of progranulin and

- neurodevelopment impairment in VPA-induced ASD rat model. *Neuropharmacology*, 196, 108689. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108689>
126. Luhach, K., Kulkarni, G. T., Singh, V. P., and Sharma, B. (2021). Attenuation of neurobehavioural abnormalities by papaverine in prenatal valproic acid rat model of ASD. *European journal of pharmacology*, 890, 173663. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173663>
 127. Elnahas, E. M., Abuelezz, S. A., Mohamad, M. I., Nabil, M. M., Abdelraouf, S. M., Bahaa, N., Hassan, G. A., Ibrahim, E. A., Ahmed, A. I., and Aboul-Fotouh, S. (2021). Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 108, 110185. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110185>
 128. Viana, C. E., Bortolotto, V. C., Araujo, S. M., Dahleh, M. M. M., Machado, F. R., de Souza Pereira, A., Moreira de Oliveira, B. P., Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Prigol, M., and Guerra, G. P. (2023). Lutein-loaded nanoparticles reverse oxidative stress, apoptosis, and autism spectrum disorder-like behaviors induced by prenatal valproic acid exposure in female rats. *Neurotoxicology*, 94, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.12.006>
 129. Zohny, S. M., Habib, M. Z., Mohamad, M. I., Elayat, W. M., Elhossiny, R. M., El-Salam, M. F. A., Hassan, G. A. M., and Aboul-Fotouh, S. (2023). Memantine/Aripiprazole Combination Alleviates Cognitive Dysfunction in Valproic Acid Rat Model of Autism: Hippocampal CREB/BDNF Signaling and Glutamate Homeostasis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 20(2), 464–483. <https://doi.org/10.1007/s13311-023-01360-w>
 130. Toubas, P. L., Abila, K. A., Cao, W., Logan, L. G., and Seale, T. W. (1990). Latency to enter a mirrored chamber: a novel behavioral assay for anxiolytic agents. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 35(1), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90215-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90215-4)
 131. Lang, A. P., and de Angelis, L. (2003). Experimental anxiety and antiepileptics: the effects of valproate and vigabatrin in the aynalı oda testi. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 25(4), 265–271. <https://doi.org/10.1358/mf.2003.25.4.769674>
 132. Olexová, L., Štefánik, P., and Kršková, L. (2016). Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amigdala and cerebellum of VPA rats - An animal model of autism. *Neuroscience letters*, 629, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.035>
 133. Wang, C. Y., Cheng, C. W., Wang, W. H., Chen, P. S., and Tzeng, S. F. (2016). Postnatal Stress Induced by Injection with Valproate Leads to Developing Emotional Disorders Along with Molecular and Cellular Changes in the Hippocampus and Amigdala. *Molecular neurobiology*, 53(10), 6774–6785. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9600-9>
 134. Shafaghi, A., Vakili Shahrabaki, S. S., Aminzadeh, A., Heidari, M. R., Shamsi Meymandi, M., and Bashiri, H. (2022). The effect of early handling on anxiety-like behaviors of rats exposed to valproic acid pre-and post-natally. *Neurotoxicology and teratology*, 89, 107050. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2021.107050>
 135. Luo, L., Chen, J., Wu, Q., Yuan, B., Hu, C., Yang, T., Wei, H., and Li, T. (2023). Prenatally VPA exposure is likely to cause autistic-like behavior in the rats offspring via TREM2 down-regulation to affect the microglial activation and synapse alterations. *Environmental toxicology and pharmacology*, 99, 104090. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104090>

136. McGaugh J. L. (2004). The amigdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual review of neuroscience*, 27, 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>
137. Prager, E. M., Bergstrom, H. C., Wynn, G. H., and Braga, M. F. (2016). The basolateral amigdala γ -aminobutyric acidergic system in health and disease. *Journal of neuroscience research*, 94(6), 548–567. <https://doi.org/10.1002/jnr.23690>
138. Loveland, K. A., Bachevalier, J., Pearson, D. A., and Lane, D. M. (2008). Fronto-limbic functioning in children and adolescents with and without autism. *Neuropsychologia*, 46(1), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2007.08.017>
139. Kim, S. Y., Choi, U. S., Park, S. Y., Oh, S. H., Yoon, H. W., Koh, Y. J., Im, W. Y., Park, J. I., Song, D. H., Cheon, K. A., and Lee, C. U. (2015). Abnormal activation of the social brain network in children with autism spectrum disorder: an FMRI study. *Psychiatry investigation*, 12(1), 37–45. <https://doi.org/10.4306/pi.2015.12.1.37>
140. Wegiel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Ma, S. Y., Imaki, H., Wegiel, J., Cohen, I. L., London, E., Wisniewski, T., and Brown, W. T. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amigdala and cerebellum. *Acta neuropathologica communications*, 2, 141. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0141-7>
141. Avino, T. A., Barger, N., Vargas, M. V., Carlson, E. L., Amaral, D. G., Bauman, M. D., and Schumann, C. M. (2018). Neuron numbers increase in the human amigdala from birth to adulthood, but not in autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), 3710–3715. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801912115>
142. Nagiub, N. H., Elrakhaw F. I., El-Nefiawy, N. E., Moustafa, A. Y. ve Ebrahim S. S. (2023). Postnatal Development of the Amigdala of Rat Offspring after Prenatal Exposure to Valproic Acid: A Histological and Morphometric Study, *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 116, Issue Supplement_1, June 2023, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcad069.106>
143. Sosa-Díaz, N., Bringas, M. E., Atzori, M., and Flores, G. (2014). Prefrontal cortex, hippocampus, and basolateral amigdala plasticity in a rat model of autism spectrum. *Synapse (New York, N.Y.)*, 68(10), 468–473. <https://doi.org/10.1002/syn.21759>
144. McDonald, A. J., Mascagni, F., and Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amigdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71(1), 55–75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00417-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00417-3)
145. Cao, B., Wang, J., Shahed, M., Jelfs, B., Chan, R. H., and Li, Y. (2016). Vagus Nerve Stimulation Alters Phase Synchrony of the Anterior Singulate Cortex and Facilitates Decision Making in Rats. *Scientific reports*, 6, 35135. <https://doi.org/10.1038/srep35135>
146. Codagnone, M. G., Podestá, M. F., Uccelli, N. A., and Reinés, A. (2015). Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism. *Developmental neuroscience*, 37(3), 215–231. <https://doi.org/10.1159/000375489>
147. Urbain, C. M., Pang, E. W., and Taylor, M. J. (2015). Atypical spatiotemporal signatures of working memory brain processes in autism. *Translational psychiatry*, 5(8), e617. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.107>
148. Mychasiuk, R., Richards, S., Nakahashi, A., Kolb, B., and Gibb, R. (2012). Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy. *Developmental neuroscience*, 34(2-3), 268–276. <https://doi.org/10.1159/000341786>

149. Richards, R., Greimel, E., Kliemann, D., Koerte, I. K., Schulte-Körne, G., Reuter, M., and Wachinger, C. (2020). Increased hippocampal shape asymmetry and volumetric ventricular asymmetry in autism spectrum disorder. *NeuroImage. Clinical*, 26, 102207. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102207>
150. Raymond, G. V., Bauman, M. L., and Kemper, T. L. (1996). Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta neuropathologica*, 91(1), 117–119. <https://doi.org/10.1007/s004010050401>
151. Abhishek, M., Rubal, S., Rohit, K., Rupa, J., Phulen, S., Gurjeet, K., Raj, S. A., Manisha, P., Alka, B., Ramprasad, P., and Bikash, M. (2022). Neuroprotective effect of the standardised extract of *Bacopa monnieri* (BacoMind) in valproic acid model of autism spectrum disorder in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 293, 115199. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115199>
152. Mallan, S., and Singh, S. (2023). Syringic acid alleviates valproic acid induced autism via activation of p38 mitogen-activated protein kinase: Possible molecular approach. *Environmental toxicology*, 10.1002/tox.23876. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/tox.23876>
153. Han, Y. M. Y., Yau, S. Y., Chan, M. M. Y., Wong, C. K., and Chan, A. S. (2022). Altered Cytokine and BDNF Levels in Individuals with Autism Spectrum Disorders. *Brain sciences*, 12(4), 460. <https://doi.org/10.3390/brainsci12040460>
154. Gao, J., Wu, H., Cao, Y., Liang, S., Sun, C., Wang, P., Wang, J., Sun, H., and Wu, L. (2016). Maternal DHA supplementation protects rat offspring against impairment of learning and memory following prenatal exposure to valproic acid. *The Journal of nutritional biochemistry*, 35, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.07.003>
155. Umka, J., Mustafa, S., ElBeltagy, M., Thorpe, A., Latif, L., Bennett, G., and Wigmore, P. M. (2010). Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neuroscience*, 166(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.073>
156. Correia, C. T., Coutinho, A. M., Sequeira, A. F., Sousa, I. G., Lourenco Venda, L., Almeida, J. P., and Vicente, A. M. (2010). Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *The Journal of Neuroscience*, 9(7), 841–848. doi: 10.1111/j1601183X.2010.00627.x.
157. Businaro, R., Corsi, M., Azzara, G., Di Raimo, T., Laviola, G., Romano, E., Ricci, S (2016). Interleukin-18 modulation in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 2. doi:10.1186/s12974-015-0466-6.
158. Ray, B., Long, J. M., Sokol, D. K., and Lahiri, D. K. (2011). Increased secreted amyloid precursor protein-alpha (sAPPalpha) in severe autism: Proposal of a specific, anabolic pathway and putative biomarker. *PLoS ONE*, 6(6), e20405. doi:10.1371/journal.pone.0020405.
159. Welbat, J. U., Chaisawang, P., Chaijaroonkhanarak, W., Prachaney, P., Pannangrong, W., Sripanidkulchai, B., and Wigmore, P. (2016). Kaempferia parviflora extract ameliorates the cognitive impairments and the reduction in cell proliferation induced by valproic acid treatment in rats. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 206, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.04.029>
160. Zhao, H., Wang, Q., Yan, T., Zhang, Y., Xu, H. J., Yu, H. P., Tu, Z., Guo, X., Jiang, Y. H., Li, X. J., Zhou, H., and Zhang, Y. Q. (2019). Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. *Translational psychiatry*, 9(1), 267. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0608-1>
161. Aranarochana, A., Sirichoat, A., Pannangrong, W., Wigmore, P., and Welbat, J. U. (2021). Melatonin Ameliorates Valproic Acid-Induced Neurogenesis Impairment: The

- Role of Oxidative Stress in Adult Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 9997582. <https://doi.org/10.1155/2021/9997582>
162. Halepoto, D. M., Bashir, S., Zeina, R., and Al-Ayadhi, L. Y. (2015). Correlation between hedgehog (Hh) protein family and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in autism spectrum disorder (ASD). *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 25(12), 882–885.
 163. Katoh-Semba, R., Wakako, R., Komori, T., Shigemi, H., Miyazaki, N., Ito, H., Kumagai, T., Tsuzuki, M., Shigemi, K., Yoshida, F., and Nakayama, A. (2007). Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 25(6), 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.07.002>
 164. Ricci, S., Businaro, R., Ippoliti, F., Lo Vasco, V. R., Massoni, F., Onofri, E., Troili, G. M., Pontecorvi, V., Morelli, M., Rapp Ricciardi, M., and Archer, T. (2013). Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotoxicity research*, 24(4), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9393-4>
 165. Ventura-Bort, C., Wirkner, J., Wendt, J., Hamm, A. O., and Weymar, M. (2021). Establishment of Emotional Memories Is Mediated by Vagal Nerve Activation: Evidence from Noninvasive taVNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(36), 7636–7648. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2329-20.2021>
 166. Steenbergen, L., Maraver, M. J., Actis-Grosso, R., Ricciardelli, P., and Colzato, L. S. (2021). Recognizing emotions in bodies: Vagus nerve stimulation enhances recognition of anger while impairing sadness. *Cognitive, affective and behavioral neuroscience*, 21(6), 1246–1261. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00928-3>
 167. Zhu, S., Qing, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Ding, F., Zhang, R., Yao, S., Kendrick, K. M., and Zhao, W. (2022). Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation increases eye-gaze on salient facial features and oxytocin release. *Psychophysiology*, 59(11), e14107. <https://doi.org/10.1111/psyp.14107>
 168. Sellaro, R., de Gelder, B., Finisguerra, A., and Colzato, L. S. (2018). Transcutaneous vagus nerve stimulation (tVNS) enhances recognition of emotions in faces but not bodies. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 99, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.11.007>
 169. Szeska, C., Richter, J., Wendt, J., Weymar, M., and Hamm, A. O. (2020). Promoting long-term inhibition of human fear responses by non-invasive transcutaneous vagus nerve stimulation during extinction training. *Scientific reports*, 10(1), 1529. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58412-w>
 170. Souza, R. R., Powers, M. B., Rennaker, R. L., McIntyre, C. K., Hays, S. A., and Kilgard, M. P. (2022). Timing of vagus nerve stimulation during fear extinction determines efficacy in a rat model of PTSD. *Scientific reports*, 12(1), 16526. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20301-9>
 171. Ferstl, M., Teckentrup, V., Lin, W. M., Kräutlein, F., Kühnel, A., Klaus, J., Walter, M., and Kroemer, N. B. (2022). Non-invasive vagus nerve stimulation boosts mood recovery after effort exertion. *Psychological medicine*, 52(14), 3029–3039. <https://doi.org/10.1017/S0033291720005073>
 172. Mathew, E., Tabet, M. N., Robertson, N. M., Hays, S. A., Rennaker, R. L., Kilgard, M. P., McIntyre, C. K., and Souza, R. R. (2020). Vagus nerve stimulation produces immediate dose-dependent anxiolytic effect in rats. *Journal of affective disorders*, 265, 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.11.090>

173. Koenig, J., Parzer, P., Haigis, N., Liebmenn, J., Jung, T., Resch, F., and Kaess, M. (2021). Effects of acute transcutaneous vagus nerve stimulation on emotion recognition in adolescent depression. *Psychological medicine*, 51(3), 511–520. <https://doi.org/10.1017/S0033291719003490>
174. Driskill, C. M., Childs, J. E., Itmer, B., Rajput, J. S., and Kroener, S. (2022). Acute Vagus Nerve Stimulation Facilitates Short Term Memory and Cognitive Flexibility in Rats. *Brain sciences*, 12(9), 1137. <https://doi.org/10.3390/brainsci12091137>
175. Chen, C. Y., Lee, H. T., Chen, C. C., Kwan, S. Y., Chen, S. J., Hsieh, L. P., Tsai, J. D., and Taiwan Child Neurology Society VNS Study Group (2012). Short-term results of vagus nerve stimulation in pediatric patients with refractory epilepsy. *Pediatrics and neonatology*, 53(3), 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2012.04.005>
176. Hull, M. M., Madhavan, D., and Zaroff, C. M. (2015). Otitis spectrum disorder, epilepsy, and vagus nerve stimulation. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 31(8), 1377–1385. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2720-8>
177. Warwick, T. C., Griffith, J., Reyes, B., Legesse, B., and Evans, M. (2007). Effects of vagus nerve stimulation in a patient with temporal lobe epilepsy and Asperger syndrome: case report and review of the literature. *Epilepsy and behavior : EandB*, 10(2), 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.01.001>
178. Kumaria, A., and Sitaraman, M. (2019). Can vagus nerve stimulation improve social cognition in autism?. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 115, 350–351. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2018.02.020>
179. Danielsson, S., Viggedal, G., Gillberg, C., and Olsson, I. (2008). Lack of effects of vagus nerve stimulation on drug-resistant epilepsy in eight pediatric patients with autism spectrum disorders: a prospective 2-year follow-up study. *Epilepsy and behavior : EandB*, 12(2), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.10.007>
180. Hamer, H. M., and Bauer, S. (2019). Lessons learned from transcutaneous vagus nerve stimulation (tVNS). *Epilepsy research*, 153, 83–84. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.02.015>

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

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-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :25/02/2020	TOPLANTI SAYISI : 03
ADI-SOYADI	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (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	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇALIKUŞU, Ayşen
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi / YÖK 100/2000 İnsan Beyni	
Yüksek lisans	Ege Üniversitesi / Tıp Fakültesi Anatomi A.B.D.	
Lisans	Ege Üniversitesi/ Hemşirelik Yüksekokulu	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2023-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi NÖROM	Proje Personeli

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Anadol, E., Demirel, M., Süntar, İ., Gültekin, S., Avdan Aslan, A., Gökçeoğlu, A., Bahcelioğlu, M., Abbasoğlu Topa, E. G., Çalikuşu, A. and Yarım, G. F. (2023). Investigation of the Effect of Melissa officinalis L. on Fetal Development by Ultrasonography in Rats. **Journal of Gazi University Health Sciences Institute**. DOI: 10.59124/guhes.1259079.

Yazılan Ulusal Kitaplardaki Bölümler:

Kitapta Bölüm Yazarlığı

1. M. Bahçelioğlu ve A. Çalikusu, Otizm Spektrum Bozukluğu Modeli Oluşturulan Kemirgenlerde Kullanılabilecek Davranış Deneyleri, Baş Editör Mustafa Arslan, Editörler: Elvan Anadol ve Abdullah Özer, Bilimsel Araştırmalarda Laboratuvar Hayvanları ve Deneysel Modeller, ISBN: 978-625-399-302-3, Akademisyen Kitabevi, Ankara, 2023,

Kitap Bölümü Çevirmenliği.

1. A. Çalikusu, Otonom Sinir Sistemi, Prof. Dr. Meltem Bahçelioğlu, Prof. Dr. Rabet Gözil, Editör, High- Yield Nöroanatomi ISBN: 978-605-282-630-0, Palme Yayınevi, Ankara, 2021
2. O. Bilge and A. Çalikusu, Kalp Odacıkları ve Thorax İle İlişkili Damarlar Ve Sinirler, S. Çelik, B. Bilecenoğlu, Y. Uyanıkgil and O. Bilge [Editörler], Dış Hekimliği İçin Anatomi'nin Temelleri ISBN: 978-605-7607-06-5, TÜRKİYE: İstanbul Tıp Kitabevleri, 01 Mart 2019

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. A. Çalikusu, E. Topa, H. Kılınc, K. Atalar, E.D. Barç, H. Bolay, M. Bahcelioglu, “Bilateral Transauricular Vagal Nerve Stimulation Modifies Social Adaption, Anxiety, And Neurodevelopmental Biomarkers In An Autism Model: Sex Matters”, 11th IBRO World Congress of Neuroscience, Granada, Spain on 9-13 September 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.08.023>
2. Atalar K., Alim E., Çalikusu A., Topa E., Gok Dagıdır H., Bahcelioglu M., Bukan N., Bolay H. “The Effects of bilateral transauricular vagus nerve stimulation induced acute inflammation and pain behavior”, 11th IBRO World Congress of Neuroscience, Granada, Spain on 9-13 September 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.08.681>
3. Gok Dagıdır H., Bukan N., Çalikusu A., Alim E., Akarca Ö., Bahcelioglu M. “Transauricular vagal nerve Stimulation effects on pro- and anti-inflammatory cytokines in an experimental model of autistic mice”, 11th IBRO World Congress of Neuroscience, Granada, Spain on 9-13 September 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.08.1128>
4. Barç E.D. ve Çalikusu A. “Use of the C57BL/6 Mouse Model in Autism Spectrum Disorder”, 3rd International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology (SANAR2022), S-3, 3. Nevşehir, Turkey, 6 - 8 October 2022, ISBN: 978-605-72063-0-5
5. İnce M. S., Gözil R., Çalikusu A., Bahçelioğlu M. “Morphological Changes in the Brain in Autism Spectrum Disorder” 3rd International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology (SANAR2022), ISBN: 978-605-72063-0-5

6. A. Calikusu and H. Ucerler, “Multiple Variations in Upper Limb of a Single Cadaver”, 19th National Anatomy Congress and 1st. International Mediterranean Anatomy Congress, Anatomy 2018;12 (Suppl 2), S:183. ISSN: 1307-8798.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Anadol,E., Demirel,M.A., Süntar,İ., Avdan Aslan,A., Gültekin,S., Gökçeoğlu,A., Bahçelioğlu,M., Abbasoglu Topa,E.G., Calikusu,A.,YarimG.F., ”Melissa Officinalis Ekstraktının Sıçanlarda Fetal Gelişim Üzerindeki Etkinliğinin Ultrasonografik Olarak Değerlendirilmesi”, 5. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi, 14-16 Eylül 2023, İstanbul, Turkey
2. Çalıkuşu, A., Abbasoğlu Topa, E. G., Kılınç, H., Atalar, K., Barç, D. E., Belen, H. B., Bahçelioğlu, M. “Behavioral changes induced by transauricular vagal nerve stimulation in experimental autism spectrum disorder model”. 21. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 8-11 Haziran 2023 Bolu/Türkiye
3. Çalıkuşu A., Abbasoğlu Topa E. G., Bahçelioğlu M., “Otizm Spektrum Bozukluğu Oluşturulan Kemirgen Modellerinde Kullanılabilecek Davranış Deneyleri”, 20. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 20 - 23 Ekim 2022, İstanbul, Türkiye.
4. A. Calikusu, H. Kilinc, E. D. Barc and M. Bahcelioglu “Trace Hulusi Behçet's history of medicine”, 17th Turkish Neuroscience Congress, 4–7 April 2019.
5. A. Calikusu, M. B. Solmazer, M. D. Yoruk, F. Oltulu and O. Bilge, “Anatomik Örnek Modeli: Epoksi İçinde Böbrek Kesiti”, Anatomi Kıs Günleri 2018, 25-28 Ocak 2018.

Sertifikalı Ulusal Eğitim Kursunda Eğitici

1. TUBİTAK 2237-A Nörolojik Hastalıkların Deneysel Hayvan Modelleri Kursu, 28-30 Temmuz 2023
2. 21. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İnsan ve Sıçan Beyninin Karşılaştırmalı Nöroanatomi, 08-11 Haziran 2023
3. 21. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Nörolojik Hastalıkların Deneysel Hayvan Modelleri, 08-11 Haziran 2023

Aldığı Sertifikalar ve Katılım Belgeleri:

1. Gazi Üniversitesi, Proje Yazma Eğitimi
2. I. Western Blot Analiz ve Görüntüleme Sistemi Teorik ve Uygulamalı Eğitimi
3. 11th Winter School "Ethics of Neuroscience and AI" – Certificate is awarded 3 ECTS for their participation.
4. Sağlık Bilimleri Alanında TUBİTAK Projeleri Hazırlama ve Yönetme Eğitimi
5. Hücre Kültürü ve Sonrası Araştırma Yöntemleri Kursu
6. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
7. Temel Yaşam Desteği Eğitimi



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

