



**VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN RAT
OTİZM MODELİNDE TEDAVİ
YÖNTEMLERİNİN ETKİNLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Recep KEŞLİ

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT

Tez No: 2021-005

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİKANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN RAT OTİZM
MODELİNDE TEDAVİ YÖNTEMLERİNİN ETKİNLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Recep KEŞLİ**

**Danışman
Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT**

Tez No: 2021-005

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:
"17.SAĞ.BİL.31"**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda** Recep KEŞLİ tarafından hazırlanan “Valproik asit ile deneysel olarak oluşturulan rat otizm modelinde standart tıbbi yöntemler ile tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavi yöntemlerinin etkinliklerinin karşılaştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 25/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından ~~oy birliği/oy çokluğu~~ ile **YÜKSEK LİSANS/ DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Gülcan AVCI

İmza

Üye

Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT

(Danışman)

İmza

Üye

Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

İmza

Üye

Doç.Dr. Nadir KOÇAK

İmza

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Muhsin ELMAS

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../..... / 2021 tarih ve
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/08/2021

İmza

Recep KEŞLİ

ÖZET

Valproik Asit ile Oluşturulan Rat Otizm Modelinde Tedavi Yöntemlerinin Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Otizm spektrum bozukluğu (OSB); sosyal becerilerde, öğrenme becerilerinde, dil becerilerinde gerileme ve ardışık anlamsız tekrar hareketleri ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizm prevalansı ülkeler ve eyaletlere göre değişiklik göstermekle (% 0.5-5) birlikte, dünya genelinde görülme sıklığında, hızlı ve dramatik bir artış görülmektedir.

Bu çalışmada VPA ile indüklenme metodu ile sıçanlarda RAT deney hayvanı otizm modellemesi gerçekleştirilmiştir. Çalışma ile hastalık grubunda otizmde görülen davranış bozukluklarının meydana gelip gelmediği, beyinde meydana gelen nöroimmünopatolojik değişikliklerin, beyin dokusunda IL1 β , IL6, TNF α , GPX, MDA, ve CASP3 düzeylerinin, *CC2D1A* ve *CASP3* gen ekspresyonları (RT-PCR) ile otizm arasındaki ilişkilerin belirlenmesi ve elde edilen verilerin kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunlara ilaveten modern tıp tedavilerinde kullanılan fingolimod, suramin, ve N-asetil sistein ile alternatif ve tamamlayıcı tıp tedavilerinde kullanılan kurkumin, resveratrolün otizmde görülen davranış bozukluklar üzerine iyileştirici etkilerinin olup olmadığının, ve ayrıca *CC2D1A* ve *CASP3* gen ekspresyon seviyeleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan toplam 30 adet dişi sıçanlardan 25'ine otizm modellemesi için VPA indüksiyonu uygulanmış iken, 5'ine VPA indüksiyonu uygulanmamıştır. Yirmibeş adet anne sıçanlardan doğan otistik bebek sıçanlardan 48'i hastalık grubunu, 5 adet sağlıklı anne sıçanlardan doğan 8 bebek sıçanlar ise sağlıklı kontrol grubunu oluşturmuştur. Hastalık Grubunu oluşturan, yavru sıçanlar (48), herbiri 8'er adet yavru sıçanlar içeren 6 alt gruba ayrılmıştır ki; bunlardan beşi tedavi grubunu; biri ise hastalık (tedavi) kontrol grubunu oluşturmuştur. Beş tedavi gruplarının her birine, beş ajanlardan birisi verilmiştir. Hastalık (tedavi) kontrol grubuna hiçbir ajan verilmemiştir. Hastalık grubu ile tedavi gruplarından elde edilen veriler kendilerine ait kontrol gruplarından elde edilen veriler ile karşılaştırılmış ve

istatistiksel analizler yapılmıştır. Kognitif fonksiyonları değerlendirmek için Water Maze Davranış testi uygulanarak skorlanmıştır. Sakrifikasyon işlemi sonrası elde edilen beyin doku materyallerinden ELISA yöntemi ile IL1 β , IL6, TNF α GPX, MDA, ve CASP3 düzeyleri ölçülmüştür. Beyin dokularından RT-PCR yöntemi ile *CC2D1A* ve *CASP3* gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Beyin dokularından elde edilen materyallerden hazırlanan ve hematoksilin eozin (H&E) ile boyanan slaytların histopatolojik mikroskobik incelemeleri yapılmıştır.

Hastalık Grubu ile Kontrol grubu Davranış test sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Davranış bozukluklarının iyileştirici etkilerine ait fingolimod, suramin, kurkumin, ve resveratrol tedavi grupları sonuçları ile tedavi kontrol grubu sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldığında, tedavi gruplarının dördünde de istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Suramin verilmesi davranış testleri üzerine istatistiksel anlamlı fark olacak derecede olumsuz etki oluşturmuştur. N-Asetil sistein tedavi grubu ile tedavi kontrol grubu sonuçlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Histopatolojik incelemelerde beyinde kramatolizis, fokal glial hücre infiltrasyonu, nöronofaji alanları, nöronal vakuolizasyonlar, nöroenflamasyon belirlenmiştir. Beyinde görülen histopatolojik anormal bulguların iyileştirici etkilerine ait fingolimod, suramin, ve N-asetil sistein, kurkumin ve reseveratrol tedavi grupları, ile hastalık (tedavi) kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırmasında; bütün tedavi grupları istatistiksel anlamlı farklı bulunmuştur. Beyinde görülen histopatolojik anormallikler için en güçlü iyileştirici etkinin fingolimod tedavi grubunda olduğu belirlenmiştir.

Tedavi grupları ile tedavi kontrol gruplarından elde edilen bütün ELISA ölçüm sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; fingolimod tedavi grubu ile tedavi kontrol grubu sonuçlarında sadece GPX ($p<0.05$) ve CASP3 ($p<0.05$) test sonuçları, fingolimod tedavi grubunda istatistiksel anlamlı farklı olarak bulunmuştur.

Genetik, epigenetik, ve çevresel faktörlerin otizmin etiyopatogenezi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Genetik faktörlerden *CC2D1A* geni, çift kıvrımlı ve C2 domain içeren protein 1A geni olup; bir serotonin reseptör 1A (HTR1A) ekspresyon baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır. Maalesef *CASP3* gen ekspresyonuna ait anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Hastalık grubu ile kontrol grubu *CC2D1A* gen

ekspresyon seviyesi sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Tedavi gruplarında *CC2D1A* gen ekspresyonu baskılama etkisi açısından tedavi kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda fingolimodun ($p<0,05$) kurkumin ($p<0,05$) ve resveratrol ($p<0,05$) tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı farklar bulunmuş iken; suramin ($p>0,05$) ve N-asetil sistein ($p>0,05$) tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı farklar bulunmamıştır. Bütün tedavi grupları içinde, fingolimodun *CC2D1A* gen ekspresyonu baskılamada en güçlü etkiye sahip olduğu kurkumin ve resveratrolün ise sırası ile aynı etkiye sahip oldukları bulunmuştur.

Otistik beyinde farklı nöro-immünopatolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Çalışmadan; otistik davranış bozuklukları gelişimi ve gen ekspresyonlarının, beyinde meydana gelen bu patolojik değişiklikler ile tetiklendiği sonucu çıkarılabilir. Ayrıca aşağıdaki sonuçlar da elde edilmiştir;

1. Modern tıp tedavilerinde kullanılan fingolimod ile tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavilerinde kullanılan kurkumin ve resveratrolün; otizm ile ilişkili olduğu bulunan *CC2D1A* gen ekspresyon seviyelerini baskılayıcı etkilerinin olduğu, fingolimodun ekspresyonda en güçlü etkiye sahip olduğu, fingolimod ile resveratrolün otistik bozuklukların iyileştirilmesinde en etkili iki ajan oldukları,
 2. Suramin verilmesinin davranış bozukluklarını olumsuz olarak etkilediği,
 3. *CC2D1A* gen ekspresyon seviyesinin kiritk öneme sahip olduğu, ve hipo veya hiper ekspresyonun otizm sürecinde negatif sonuçları tetiklediği
- Sonuçlarına ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler:*CC2D1A* geni, Deney Hayvan Modeli, Nöro-immünoptaoloji, Otizm Spektrum Bozukluğu, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp, Valproik Asit.

SUMMARY

Comparison of Efficiency of Treatment Methods in Valproic Acid Induced Rat Model of Autism

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by regression in social skills, learning skills, language skills and successive pointless repetition. Although the prevalence of autism varies by countries and states (0.5-5 %), there is a rapid and dramatic increase in the incidence worldwide.

VPA induced animal model of autism in rats was carried out in this study. Determination of whether autistic behaviour disorders exist or not, neuro-immunohistopathologic changes occurred in the brain, IL1 β , IL6, TNF α , GPX, MDA, and CASP3 levels in the brain tissue, relationship between autism and *CC2D1A*, *CASP3* gene expression levels (RT-PCR) in the Control Group, and compare the obtained data statistically with Control Group were aimed in the study. In addition to these, investigation of whether fingolimod, suramin, and N-acetyl cysteine used in the modern medicine treatments, and curcumin, resveratrol used in the complementary and alternative medicine treatments, have ameliorating effect on the autistic behaviour disorders or not, effects on the expression levels of *CC2D1A* and *CASP3* genes, and comparison of results obtained from both the two treatment groups, with each other also were aimed in the study.

Of the totally 30 female rats used in the study, while 25 were induced by VPA for autism modelling, 5 were not induced by VPA. Forty eight pups delivered from the 25 mother rats were included to disease group, and eight pups delivered from 5 healthy mother rats were included to the healthy control group. All the pups included to the disease group (48) were divided into six subgroups that; five of them were consisted treatment groups and the one was disease (treatment) control group. One of the five agents were administered to each of the five treatment groups. No agent was administered to the disease (treatment) control group. Data obtained from the patient and treatment groups were statistically compared with control groups of each ones.

Water Maze behaviour test were performed and scored in order to assess cognitive functions. IL1 β , IL6, TNF α , GPX, MDA, and CASP3 levels were assayed by ELISA method in the brain tissue materials obtained after sacrifice procedure. Expression levels of *CC2D1A* and *CASP3* genes were determined in the brain tissue by RT-PCR method. Histopathologic microscopic examinations were made with slides prepared from brain tissue materials and stained with hematoxylin-eosin (H&E).

Behaviour test results of the disease group and control group were found statistically significantly different ($p < 0,05$). Statistically significant difference were found when comparing the results of the ameliorative effects of the fingolimod, suramin, curcumin, and resveratrol groups with each disease (treatment) fourth of the control groups ($p < 0,05$). Suramin administration created negative effect on behaviour test with statistically significant difference degree. No statistically significant difference were found when comparing of the N-acetyl cysteine treatment group's results with the disease (treatment) control group ($p > 0,05$). Chromatinolysis, focal glial cell infiltration, areas of neuronophagy, neuronal vacuolation, neuroinflammation were found in the brain with histopathological examinations. Results of ameliorative effects of histopathological abnormal brain findings; fingolimod, suramin, and N-acetyl cysteine treatment groups compared with each treatment control group; all the treatment groups were found statistically different. The strongest ameliorative effect for histopathological brain abnormalities were found in the fingolimod treatment group.

When all the ELISA assay results evaluated comparatively obtained from treatment groups and treatment control groups; only GPX ($p < 0,05$) and CASP3 ($p < 0,05$) test results were found to be statistically significant difference at fingolimod treatment group.

It was reported that etiology of the autism was related with genetic, epigenetic, and environmental factors. Of the genetic factors *CC2D1A* gene; the coiled-coil and C2 domain containing protein 1A (*CC2D1A*) gene was identified as a repressor of serotonin receptor 1A (*HTR1A*) expression. Unfortunately meaningful results were not able to be found for CASP3 gene expression levels. *CC2D1A*

expression level results of the disease group and control group compared to each other; statistically significant difference was found ($p < 0,05$).

When compared repressor effect of the treatment groups for *CC2D1A* gene expression with treatment control group; while fingolimod ($p < 0,05$), curcumin ($p < 0,05$), and resveratrol ($p < 0,05$) were found to be statistically significant difference; statistically significant difference was not found at suramin ($p > 0,05$) and N-acetyl sistein ($p > 0,05$) treatment groups. Of all the treatment groups fingolimod has the strongest repressor effect on the *CC2D1A* gene expression, and curcumin and resveratrol have the same effect respectively.

Different neuro-immunopathologic changes occurred in the autistic brain. Development of autistic behavior disorders and gene expressions may be triggered by these pathologic changes, can be concluded from the study. In addition, the following results were also obtained;

1. Fingolimod used for modern medicine therapies, curcumin and resveratrol used in the alternative and complementary therapies were found as repressors of the *CC2D1* gene, and fingolimod was the strongest repressor effect, fingolimod and resveratrol was found as the most effective two agents for amelioration of the autistic disorders.
2. Suramin administration effected behaviour disorders as negativeley.
3. Expression elvels of *CC2D1A* gen has cirritical value, and hipo or hiper expressions trigerring negative results with survive of autism.

Keywords: Animal Model, Autism Spectrum Disorder, *CC2D1A* Gene, Complementary and Alternative Medicine, Neuro-immunopathology, Valproic Acid.

ÖNSÖZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda sürdürerek tamamladığım doktora eğitimim müddetince birçok konuda kendilerinden çok şeyler öğrendiğim Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cevdet UĞUZ hocama, doktora eğitimimde ve tez çalışmalarımnda her zaman beni destekleyen, yol gösteren Danışman Hocam ve Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT hocama, birçok konuda kendisine başvurduğum ve her zaman yardımcı olan Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Metin ERDOĞAN hocama, değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Gülcan AVCI hocama, ve değerli Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGER hocama şükranlarımı sunarım.

Yetişmemde çok büyük emekleri olan ve yakın zamanda aramızdan ayrılan fedakar ve çok değerli Babacığım ve aile ocağımızın hayattaki direği olan kıymetli Anneme şükranlarımı sunar merhum Babamı Rahmet ile yad ederim.

Hayatta her zaman, her konuda en büyük destekçim, göz ışığım, ve yoldaşım olan sevgili eşime ve kendilerinden ilham aldığım çocuklarıma sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına verdiği destek için teşekkür ederim.

Recep KEŞLİ

Afyonkarahisar

2021

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: ‘17.SAĞ.BİL.31’

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	vi
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER.....	xiii
ÇİZELGELER.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) Tanımı, Prevalansı, Etiyolojisi.....	1
1.1.1. OSB Tanımı.....	1
1.1.2. OSB Prevalansı.....	1
1.1.3. OSB Etiyolojisi.....	2
1.2. OSB İle İnsan Bağırsak Mikrobiyotası Arasındaki İlişki.....	2
1.2.1. Bağırsak-Beyin Bariyeri (BBB).....	6
1.2.2. Kan-Beyin Bariyeri (KBB).....	7
1. 3.OSB’de Fonksiyonel Gastrointestinal Bozukluklar.....	9
1.4. Belirgin OSB Mikrobiyomu Kanıtı.....	11
1. 5. Terapötik Mikrobiyoloji Tedavi Stratejileri İçin Kanıt.....	13
1.6. Beyin-Bağırsak-Mikrobiyom Araştırmasının Gelecekteki Yönelim Ve Potansiyelleri.....	17
1.7. OSB Ve Nöro-İmmünopatoloji.....	18
1. 8. Otizm İmmüno-Patolojisinde Rol Oynayan Elemanlar.....	21
1.8.1.T Hücreleri.....	21
1.8.2. B Hücreleri.....	22

1.8.3. Periferik Monokluat Hücreler.....	23
1.8.4. Doğal Öldürücü (Natural Killer NK) Hücreler.....	25
1.8.5.Dentritik Hücreler.....	26
1.8.6. İmmünoglobulin Değişikliği.....	26
1.8.7. Sitokinler ve Kemokinler.....	27
1.8.8. Otoantikorlar.....	28
1.9. Otizm ve Genetik.....	30
1.10. Otizm ve CC2D1A Geni.....	35
1.11. Deneysel Hayvan Modelleri Ve Otizm.....	37
1.12. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp ve Otizm.....	39
2. MATERYAL VE METOD.....	44
2.1. Etik Kurul Onayı.....	44
2.2. Deneysel Otizm Modellemesi Ve Uygulanması.....	44
2.3. Deney Hayvanları Ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	45
2.4. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi Ve Beyin Dokusu Örneklerinin Alınması.....	48
2.4.1.Histopatolojik İnceleme.....	48
2.5. Gen Ekspresyon Analizleri.....	49
2.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	49
2.5.2. Real Time PCR Analizleri.....	50
2.5.3. Data Analizleri.....	50
2.5.4. Kullanılan Primerler.....	50
2.6. ELISA Ölçümleri.....	51
2.6.1. Rat Beyin Dokusu Homojenizasyonu.....	51
2.6.2. ELISA Ölçümlerinin Uygulanması.....	51
2.6.3. ELISA Çalışma Protokolü-1 (TNF α , IL1 β , IL6).....	52

2.6.4. ELISA Çalışma Protokolü-2 (GPX, MDA, CASP3).....	54
2.7. İstatistik Analizleri.....	55
2.7.1. Davranış Testleri Verileri Analizi.....	56
2.7.2. ELISA Verileri Analizi.....	56
2.8. Water Maze Testinin Yapılışı (Morris Su Labirenti Testi, Öğrenme Testi).....	56
3. BULGULAR.....	58
3.1. Davranış Testi Bulguları.....	58
3.2. ELISA Ölçümlerine Ait Bulgular.....	68
3.21. CC2D1A Geni mRNA Ekspresyon Bulguları.....	75
3.4. Histopatolojik İnceleme Bulguları.....	76
4. TARTIŞMA.....	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
6. KAYNAKLAR.....	93
7. EKLER.....	
HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	
Ek 7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.....	
Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
ÖZGEÇMİŞ.....	
HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Bağırsak Beyin Eksen (Martin vd., 2018).....	5
Şekil 1.2: Mikrobiyota Bağırsak Beyin Eksen İki Yönlü Etkileşim (Luna vd., 2016).....	13
Şekil 1.3: Mikrobiyota-Bağırsak-Beyin Eksen ve Otizm Spektrum Bozukluğunda Potansiyel Rolü. (Li ve Zhou, 2016).	16
Şekil 1.4: Otizm Spektrum Bozukluğu ile Meydana Gelen Nöroenflamasyon Süreci (Matta vd., 2019).....	19
Şekil 1.5 İnsanlarda CC2D1A Geni Lokalizasyonu (İnt. Kyn.2).....	36
Şekil 1.6 Sıçanlarda CC2D1A Geni Pozisyonu (İnt. Kyn.4).	37
Şekil 3.1: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.	58
Şekil 3.2: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.....	59
Şekil 3.3: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu	60
Şekil 3.4: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.	61
Şekil 3.5: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.	62
Şekil 3.6: Hastalık Grubu ve Kontrol Grubu Karşılaştırması.....	63
Şekil 3.7: Her Grubun Ortalama Değerlerinin Karşılaştırması.	64
Şekil 3.8: Kontrol Grubu ve Hastalık Grubu Ortalamalarının Karşılaştırması.	65
Şekil 3.9: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubunun Gün Gün Karşılaştırması (Her Renk 1 Günü İçermektedir).....	66
Şekil 3.10: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.....	66
Şekil 3.11: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.....	67
Şekil 3.12: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.....	67
Şekil 3.13: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.....	68
Şekil 3.14: Grupların Bütün Olarak Karşılaştırmaları.....	68
Şekil 3.15: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları İnterlökin 1 Beta (IL1 β) ELISA Test Sonuçları.....	70
Şekil 3.16: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları İnterlökin 6 (IL6) ELISA Test Sonuçları.....	71

Şekil 3.17: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF α) ELISA Sonuçları.....	72
Şekil 3.18: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Glutasyon Peroksidaz (GPX) ELISA Sonuçları.....	73
Şekil 3.19: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Malondialdohit (MDA) ELISA Sonuçları.....	74
Şekil 3.20: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Kaspaz 3 (CASP3) ELISA Sonuçları.....	75
Şekil 3.21: Hastalık Kontrol Grubu ile Tedavi Grupları CC2D1A Geni mRNA Ekspresyon Karşılaştırması. (NAC: N-Asetil Sistein) (Disease Control: Hasalık Kontrol).....	76
Şekil 3.22: İlaç Uygulamasının Ratların Birinci Ay (A1, B1, C1, D1, E1) ve İkinci Aya (A2, B2) Ait Beyin Dokularında Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler.....	78
Şekil 3.23: İlaç Uygulamasının Ratların (A, B, C, D, E, F, G) Beyin Dokularında Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler.	79

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1: Otizm ile ilişkili genler ve sorumlu oldukları davranışlar.....	34
Çizelge 3.1: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması...	58
Çizelge 3.2: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.....	59
Çizelge 3.3: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.	60
Çizelge 3.4: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması	61
Çizelge 3.5: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması	62
Çizelge 3.6: Hastalık Grubu ve Kontrol Grubu Karşılaştırması.....	63
Çizelge 3.7:Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları ELISA Test Sonuçları Ortalama Değerleri Karşılaştırması.....	69
Çizelge 3.8: Hastalık Kontrol Grubu ile Tedavi Grupları CC2D1A Geni mRNA Ekspresyonu İstatistiki Karşılaştırması.....	76
Çizelge 3.9: Bütün Çalışma Gruplarına Göre Elde Edilen .. Bulgular.....	79
Resim 1: Water Maze Testi Platformu.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ANOVA:** Analysis of Variance (ANOVA)
- ASD:** Autism Spectrum Disorder
- BBB:** Bağırsak Beyin Bariyeri
- BBB:** Blood Brain Barrier
- BBB:** Bowel Brain Barrier
- BBE:** Bağırsak Beyin Eksen
- Bkz.:** Bakınız
- ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbant Assay
- CASP3:** Caspase3
- f:** Frekans.
- F:** Varyans analizine (ANOVA) ilişkin parametre
- GBA:** Gut Brain Axis
- GIS:** Gastro Intestinal System
- GPX:** Glutathion Peroxidase
- ICV:** Intra cerebro ventricular
- IL1 β :** Interleukin 1 beta
- IL6:** Interleukin 6
- KBB:** Kan Beyin Bariyeri
- KZYA:** K1sa Zincirli Yağ Asitleri
- MBBE:** Mikrobiyota Bağırsak Beyin Eksen
- MDA:** Malendialdohyte
- MGBA:** Microbiota Gut Brain Axis
- MSS:** Central Nervous System
- MSS:** Merkezi Sinir Sistemi
- N:** Evren büyüklüğü
- n:** Örneklem büyüklüğü
- OD:** Optik Dansite
- OSB:** Otizm Spektrum Bozukluğu
- PPA:** Propionic acid
- p:** Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri
- SCFA:** Short Chain Fatty Acid
- TNF α :** Tumor Necrosis Factor Alpha
- VPA:** Valproik Asit

1. GİRİŞ

1.1. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) Tanımı, Prevalansı, Etiyolojisi

1.1.1. OSB Tanımı

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal etkileşim ve iletişim zorlukları ve tekrarlayan davranışlar ve ilgi alanları ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. OSB dünyada ve ülkemizde giderek artış gösteren yaygınlık oranları ile dikkati üzerine çekmektedir. Ayrıca günümüzde en sık rastlanan gelişimsel bozuklukların arasında yer almaktadır (Arneson vd., 2009). Dünyada tüm ırk ve etnik gruplarda görülmekte fakat sıklığı konusunda kesin bilgiler bulunmamakla birlikte yıllar içerisinde artış gösterdiği belirtilmiştir (Blumberg vd., 2013).

1.1.2. OSB Prevalansı

Görülme sıklığı ülkelere ve ülkeler içinde eyalet/bölgelere göre değişiklik göstermektedir. ABD’ de: %1,5-%3, Güney Kore: %3, Japonya: %3, Türkiye’de kesin olmayan verilere göre %1, Avrupa genelinde 0.3-%1 şeklinde olduğu bildirilmiştir (MacFabe vd., 2007; MacFabe vd., 2011; Sharon vd., 2019; Shultz vd., 2009; Shultz vd., 2008).

Hastalık Kontrol Kontrol Merkezi (CDC) raporunda Amerika Birleşik Devletleri Mental Bozukluklar Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (DSM-5) ölçütlerinin esnetilmesiyle birlikte, hasta sayısında dramatik bir artış izlenmiştir (Fombonne, 2009). 2001 yılında 1/250, 2007 yılında 1/150’de, 2009 yılında 1/110, 2012 yılında 1/68, 2014 yılında 1/59 yani her 59 çocuktan 1’inin OSB tanısı aldığını belirlenmiştir (Christensen vd., 2016).

Otizmin etiyolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi söz konusudur. Etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik olarak yapılan klinik çalışmaların yetersiz oluşu hastalığın etiyolojisinin anlaşılmasında sınırlamalara neden olmakta ve hastalık etiyopatogeneze ait gizemini korumaktadır (MacFabe vd., 2011; Sharon vd., 2019; Shultz vd., 2009; Shultz vd., 2008; Yamawaki vd., 2018).

1.1.3. OSB Etiyolojisi

Otizm etiyolojisinin üç ana bileşen ile bunların da birbirleri ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shultz vd., 2008, Yamawaki vd., 2018;);

1. Genetik Faktörler
2. Epigenetik Faktörler
3. Çevresel Faktörler

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

1.2. OSB İle İnsan Bağırsak Mikrobiyotası Arasındaki İlişki

Bağırsak mikrobiyotası, konakçıları ile simbiyotik bir ilişkisi olan karmaşık bağırsak mikrobiyal topluluğunu ifade eder (Backhed vd., 2004; Collins vd., 2012). Bağırsak mikrobiyomu bu mikrobik topluluğun kolektif genomlarını ifade ederken, bağırsak mikrobiyotası ürettikleri bakteri ve metabolitleri içerir (Backhed vd., 2005). Bileşimi sağlıklı bireyler arasında bile yüksek çeşitlilik gösterse de, bağırsak mikrobiyotasına esas olarak *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumuna ait organizmalar hâkimdir (Eckburg vd., 2005; Human Microbiome Project, 2012). "İnsan bağırsak mikrobiyota filogenetik çekirdek" analizlerinde *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Bacteroides* ve *Bifidobacterium* cinsinin üyelerini içeren örneklenmiş bireylerin en az %50'sinde bu bakteriler mevcuttur (Tap vd., 2009).Bağırsak mikrobiyotası, bağırsak bariyeri ile örtüşen bir gelişim seyrini takip eder. Bağırsak veya bağırsak bariyeri, bağırsak bariyeri geçirgenliğini düzenleyen karmaşık protein yapıları olan sıkı bağlantılarla kontrol edilen dinamik bir fiziksel bariyerdir (Kelly vd., 2015). Bağırsak bariyerinin bozulması, lümen içeriğinin kan

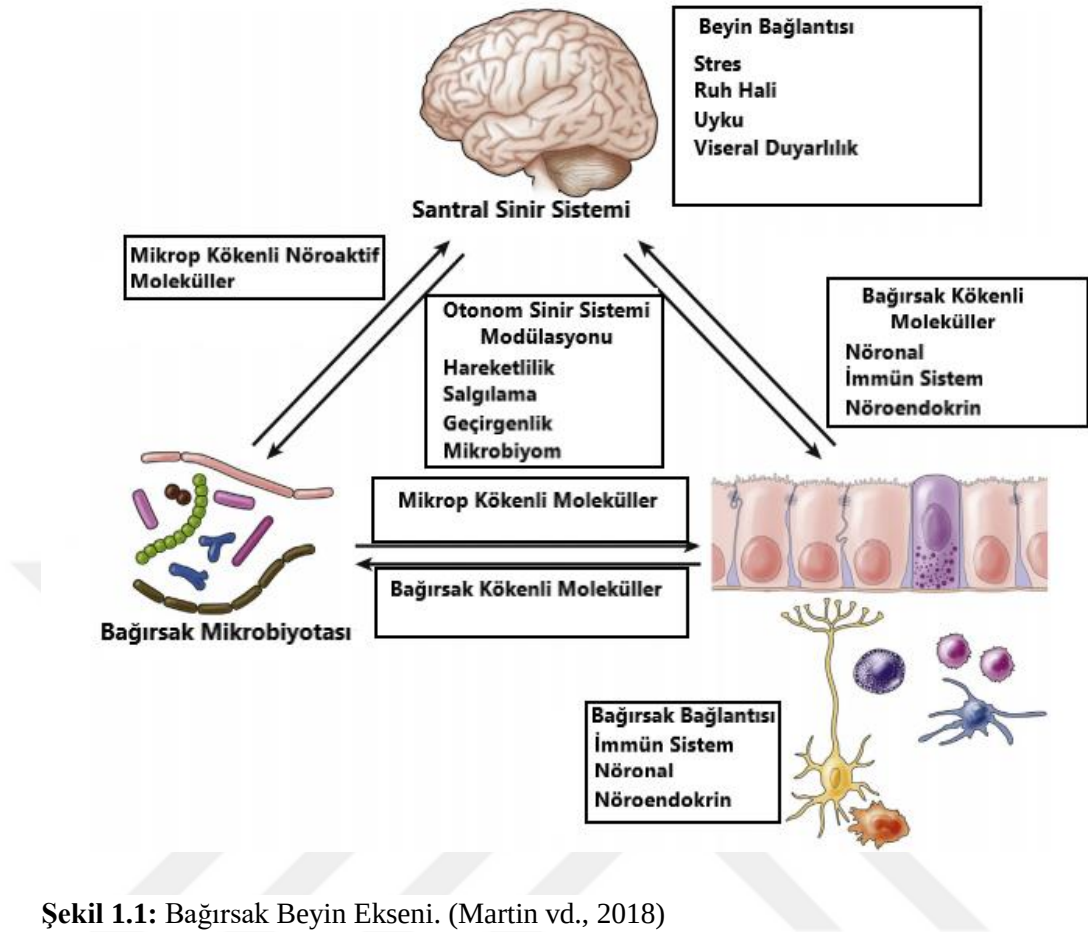
dolaşımına geçişiyle ilişkilidir, bu da bağışıklık tepkisini aktive eder (Ulluwishewa vd., 2011). Bu kapsamda bağırsak bariyerinde geçirgenlik artışı ve çeşitli gastrointestinal bozukluklar meydana gelir. Bu nedenle, bağırsak bariyerinin bütünlüğü hem bağışıklık / hasar verici tepkilerde hem de gastrointestinal semptomlarında rol oynadığı belirtilmiştir (Viggiano vd., 2015; Wang vd., 2015).

Bağırsak bariyeri bütünlüğünü etkileyen faktörlerden biri, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu ve dağılımını değiştirerek bağırsak bariyeri fonksiyonunu düzenleyen bağırsak mikrobiyotasıdır (Ulluwishewa vd., 2011). Bağırsak mikrobiyotası ayrıca besinlerin, hormonların ve vitaminlerin sentezinden ve metabolizmasından ilaçların ve toksinlerin temizlenmesine kadar birçok önemli biyolojik ve metabolik fonksiyonda yer alır; ve konakçı için başka türlü mevcut olmayan diyet kaynaklarından, bağırsak-beyin eksenini yoluyla beyin aktivitesi ve davranışının modülasyonuna enerji tedarikinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Louis, 2012; Mangiola vd., 2016; Sharon vd., 2016).

Son yıllarda, mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini, OSB davranışlarının oluşumundaki rolü için önemli bir araştırmanın odağı haline gelmiştir. Bu özellikle OSB ile ilişkili davranışlarda bağırsak mikrobiyotasını etkileyen deneysel hayvan çalışmalarının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Desbonnet vd., 2014; Li vd., 2016). OSB'li bireylerin bağırsak mikrobiyotaları için, spesifik suşların prevalansının azalması ve artmasıyla ilgili bulgular çalışmadan araştırmaya değişiklik göstermektedir ve bağırsak mikrobiyotası profili için net bir eğilim henüz ortaya çıkmamıştır. Toksin üreten *Clostridia* gibi bazı suşlarda bazı tutarlı artışlar vardır, ancak OSB, farklı çalışmalarda *Bacteroidetes* ve kısa zincirli yağ asitleri gibi bakteriyel ürünler gibi diğer suşların hem artmasına hem de azalmasına bağlanmıştır. OSB'de bulunan metodolojik farklılıklar ve heterojenlik nedeniyle ve bu bulgular, daha yüksek antibiyotik kullanımı ve OSB'li bireylerin farklı diyetleri / tekrarlayan diyet seçimleriyle karıştırılabilir (Cryan ve Dinan, 2012; Louis, 2012; Mangiola vd., 2016; Vuong ve Hsiao, 2017). Sağlıklı bireylerin mikrobiyotalarında görülen geniş heterojenlik ve OSB'deki temel bozukluğa ilaveten görülen bozukluklar ile ilgili koşulların heterojenliğini de OSB tanısı konan bireylerde semptomların değerlendirilmesi için oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. İnflamasyon veya diğer

bağırsak metabolik anormalliklerin vücudun normal bağırsak toleransını bozabilir bağırsak hastalığı olan kişiler de bu anormallikler gösterilmiştir (Macpherson vd., 1996).

OSB'li bireylerin beyinlerinde nöroglial ve doğuştan gelen nöroimmün sistem aktivasyonunun OSB fenotiplerinin çeşitliliğine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Slattery vd., 2016). Yaşamın ilk yıllarında çeşitli bir mikrobiyota ile kolonizasyon, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve düzenlenmesi için çok önemlidir. Bağırsak mikrobiyotası, yaşamın ilk yıllarında hem spesifik hem de spesifik olmayan bağışıklığı uyarır ve bağırsak mikrobiyotasının sürekli bağışıklık uyarımı genel olarak yararlı kabul edilir, ancak OSB için risk altındaki çocuklar için zararlı olabilir (Madore vd., 2016). % 80 civarında tahmin edilen bağışıklık sistemi, bağırsak mukozası içinde ve çevresinde bulunur. Bağırsak mikrobiyotası, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi spesifik suşlar üretilen sitokinler ve bağışıklık sisteminin olgunlaşmasında ve modülasyonunda önemli bir rol oynar. *Clostridium* ve *Ruminococcus* proinflamatuvar sitokinler üretir. Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişki çift yönlüdür ve OSB'nin fare modellerinde, maternal bağışıklık aktivasyonu gibi bağışıklık aktivasyonları, bağırsak mikrobiyota değişikliklerine ve sosyallik, iletişim ve tekrarlayıcı davranışlarda bozukluklara neden olur. OSB'li bireylerde bağırsak geçirgenliğinin arttığı (sızdıran bağırsak "Leaky gut") ve toksinlerin, bakteriyel ürünlerin kan dolaşımına geçerek beyin fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir (Şekil 1) (Li vd., 2017).



Şekil 1.1: Bağırsak Beyin Eksen. (Martin vd., 2018)

Doğum öncesi yıllarda veya yaşamın erken dönemlerinde görülen hasar ve immünolojik yanıtlar OSB' de rol oynamıştır. Elde edilen epidemiyolojik bulgular, 12 haftalık gebelikten sonra ilkbaharda OSB tanısı ile ilk trimesterde maternal viral enfeksiyon, ikinci trimesterde maternal bakteriyel enfeksiyon ve üçüncü trimesterde maternal ateş ile daha fazla ateşe maruz kalma riskine bağlı olarak ilişki gösterir (Atladottir vd., 2010; Hornig vd., 2018). Bu ilişki maternal ateşe özgüdür ve antipiretik ilaç kullanan annelerde ateşle ilişkili OSB riskinin antipiretik ilaç kullanmayanlara göre azaldığı hamilelik sırasında yaşanan ateşin görülmesi olası bir durumdur (Zerbo vd., 2013). Ek olarak, daha sonra OSB tanısı konan yenidoğanların, doğum öncesi veya erken doğum sonrası bağışıklık sistemi fonksiyonlarında farklı kemokin profilleri oluşmaktadır (Zerbo vd., 2014). Artan kanıtlar, OSB'de bağışıklık düzensizliği için önemli bir role işaret etmektedir, buna bağlı olarak bağışıklık düzensizliğine devam etme / kanama ve enfeksiyona girme, enfeksiyon, fetal reaktif antikorlar, otoimmünite, değişmiş bağışıklık hücresi fonksiyonu elde edilen

kanıtlardan bazılarıdır. Son zamanlarda, OSB'li bireylerden türetilmiş astrositler ve proinflatuar sitokinler (Estes ve McAllister, 2015) in daha yüksek seviyelere sahip olduğu ve kontrol kaynaklı nöronlara kıyasla fizyolojik olarak bozulmuş olduğu bulunmuştur (Estes ve McAllister, 2015; Onore vd., 2012). Elde edilen bulgular ile OSB'li bireylere ait nöronlar kontrol astrositleri ile birleştirildiğinde, OSB nöronal morfolojisi ve sinaptogenezi gelişmektedir, ancak sağlıklı bireylere ait nöronlar OSB'den türetilen astrositler ile birleştirildiğinde, kontrol nöronları OSB nöronal fenotipini göstermektedir (Russo vd., 2018). Bu bulgular, OSB'li bireylerin astrositlerindeki yangının nöron ve sinaps gelişimini etkileyebileceğini ve en azından gelen vakalarda OSB patogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Pardo vd., 2005).

1.2.1. Bağırsak-Beyin Bariyeri (BBB)

Bağırsak bariyeri 2 tabaka ile karakterizedir: sıkı kavşaklar ile birbirine bağlı epitel hücrelerinin bazal tek tabakası ve kalınlığı ve bileşimi zaman içinde değişir ve IgA salgısı ve antimikrobiyal peptidler içeren bir mukus tabakası (Kelly vd., 2015). Spesifik mikrobiyal ürünlerin tespiti üzerine GI mukoza boyunca bulunan patern tanıma reseptörleri gelişmiş antimikrobiyal savunma indüksiyonunu, bağırsak iltihaplanmasını ve hatta immünolojik toleransı artırdı (Ivanov vd., 2009; Round vd., 2011). Sağlıklı homeostatik koşullar altında birçok mikroorganizma ve makromoleküller mikro kıvrım hücreleri üzerinden giriş kazanarak (M hücreleri) bağırsakta bulunan ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku, bağışıklık hücreleri tarafından sürekli örnekleme alınmasının sağlar (Kucharzik vd., 2000). Paneth hücreleri otonom anlamda antimikrobiyal faktörleri tetikleyen MyD88-bağımlı Toll-benzeri reseptör aktivasyonuna rağmen, bakterileri özerk olarak algılar ve sonuçta konak dokuya bakteriyel penetrasyonu sınırlar (Vaishnava vd., 2008). Mikroplar ve mikrop kaynaklı ligandlar bütünlüğün kritik olan hücre-hücre kavşaklarını korumaya yardımcıdır (Hooper vd., 2001; Rakoff-Nahoum vd., 2004). Probiyotik tedavisinde bilinmeyen mekanizmalar aracılığıyla strese bağlı bariyer kusurlarında normalleşmeye yardımcı olabilir (daha sonra tartışıldı) (Da Silva vd., 2014).

Kolon mukus tabakası 2 katman halinde düzenlenmiştir: daha kalın gevşek dış tabaka ve epitele sıkıca bağlı bir iç tabaka (Atuma vd., 2001). Kommensal mikroplar

dış tabaka içinde yaşıyor, biyofilm için kritik bir yaşam alanı oluşturur ve glikoproteinler açısından zengin, güvenilir bir enerji kaynağı içinde bulunur, bu da diyet lifinden yoksun olduğu zaman mikrobiyotanın bozulmasına, daha sonra patojen duyarlılığın artmasına neden olur (Desai vd., 2016; MacFarlane, ve Dillon, 2007). İç tabaka genellikle bakteri içermez ve fiziksel ayırma yoluyla mikrobiyal temas epitel hücreleri korumak için hizmet vermektedir, antimikrobiyal peptidler de dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları ve IgA salgısı dahil adaptif bağışıklık olayları var (Johansson vd., 2011).

1.2.2. Kan-Beyin Bariyeri (KBB)

Kan-Beyin Bariyeri (KBB) dolaşım sistemi ve MSS'nin beyin omurilik sıvısı arasındaki moleküler trafiği düzenler. Bağırsak mikrobiyotası okludin ve klaudin-5 de dahil olmak üzere sıkı kavşak proteinlerin ekspresyonunu düzenleyebilir, bu nedenle BBB geçirgenliğini azaltır (Braniste vd., 2014). İntrauterin yaşamdan yetişkinliğe kadar GF fareleri kontrollerle karşılaştırıldığında daha geçirgen bir bariyere sahiptir, ama GF yetişkinlerinin normal bağırsak mikrobiyotası kısmen fonksiyonu geri getirir. Geçirgenlik, SCFA üreten bakterilerin monokolonizasyonu ve sodyum bütiratla oral lavaj ile azalır. SCFA'lar BBB gelişim ve bakımından hücrelere girerek fenotip ve epigenetik olarak, histon deasetilaz inhibitörleri olarak veya GPR41 ve/veya GPR43'e bağlanma yoluyla çalışan birincil sinyal metaboliti olarak hizmet verebilir (Brown 2003 vd., Michel ve Prat, 2016).

Sistemik immün aktivasyon BBB değişikliklerine neden olabilir ve genellikle LPS kullanılarak modellenmiştir. Ancak sistematik bir incelemede in vivo LPS etkilerini BBB fonksiyonu üzerinde değerlendiren çalışmalar sadece zamanla %60 bozulma gösterdi, potansiyel yayın yanlılığına maruz kaladı (Varatharaj ve Galea, 2017). İlginçtir ki, ev sahibi türlerde varyansı açıklayan tek önemli belirleyici: farelerde BBB değişim gösterme olasılığı sıçanlardan 4 kat daha muhtemeldir. Doza bağlı etkiler tüm çalışmalarda gözlenmemiş olmakla birlikte, kullanılan düzeyler çoğunlukla septik dozlara eşdeğerdi. Sistemik immün aktivasyon modelinde BBB yanıtının değişkenliği, özellikle patolojik olmayan durumlarda çoğu preklinik bulguların insan mikrobiyom etkileşimlerine genellenebilirliğini sınırlar.

Beyin-bağırsak-mikrobiyom eksenini, merkezi sinir sistemi, gastro-intestinal (GI) sistem ve gastrointestinal sistemde yaşayan mikroorganizmalar arasındaki etkileşimleri ifade eder. Bu etkileşimlerin araştırılması otizm spektrum bozuklukları (OSB) olan çocuklarda gastrointestinal bozuklukların neden yaygın olarak ortaya çıktığının bir mantığını sağlar. Fonksiyonel GI bozuklukları (FGID) ile yakından ilişkili olan değişmiş beyin-bağırsak etkileşimlerinin belirtileri, OSB'li çocuklarda yaygın olarak ortaya çıkar. OSB'deki mikrobiyom çalışmaları, bağırsak mikrobiyomundaki değişikliklerin OSB'li çocuklarda OSB ve GI bozuklukları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Beyin-bağırsak-mikrobiyom eksenine yönelik daha ileri çalışmalar, OSB'li çocuklarda GI bozukluklarını tanımlamak için yeni tekniklere ve OSB davranışlarını tedavi etmek için yeni tedavilere yol açabilir.

Beyin-bağırsak-mikrobiyom eksenini merkezi sinir sistemi (MSS), GI sistemi ve bağırsakta yaşayan trilyonlarca mikroorganizma arasındaki son derece entegre etkileşim ve iletişimi ifade eder (Şekil 3). Bu etkileşimlerden ortaya çıkan çalışmalarda bu eksenindeki değişikliklerin otizm spektrum bozuklukları (OSB) dahil olmak üzere çeşitli bozukluklarda sağlık ve refahta düzenleyici bir rol oynayabileceğini göstermektedir. OSB'nin en son DSM-5 tanımına dayanarak OSB tanısı alan bir birey sosyal iletişim ve etkileşimlerin yanı sıra sınırlı ve/veya tekrarlayan davranış, ilgi veya etkinlik kalıplarında kalıcı açıklar da sergilemektedir (American Psychiatric Association, 2013).

Çeşitli çalışmalar OSB ve GI fonksiyonu arasında yakın bir ilişki ortaya koymaktadır. Yakın zamanda yapılan bir metaanaliz, GI bozukluklarının OSB'li çocuklarda nörotipik gelişimi olan çocuklara göre daha yüksek oranlarda ortaya çıktığını göstermektedir (McElhanon vd, 2014). Diğer çalışmalar GI bozukluklarının, özellikle inkontinanslı ve inkontinanssız fonksiyonel kabızlıkların varlığının OSB kriterlerini karşılama olasılığı yüksek olan çocukların belirlenmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir (Peeters vd., 2013). Bu bulgular OSB ve GI bozukluklarının o kadar yakından ilişkili olduğunu, OSB'li çocukların GI bozuklukları için taranması gerektiğini ve özellikle GI bozukluğu olan çocukların OSB taraması yapılması gerektiğini göstermektedir.

Çocukların herhangi bir popülasyonundaki GI bozukluklarının değerlendirilmesi ve tedavisi zordur, ancak OSB'li çocuklarda özellikle zordur. OSB ile ilişkili çeşitli

davranışsal ve gelişimsel açıklar, sadece sağlayıcıların OSB'li çocuklarda GI bozukluklarını tedavi etme yeteneğini değil, aynı zamanda bu çocuklarda GI disfonksiyonunun ne zaman oluştuğunu da belirler. Birçok OSB'li çocuk karın rahatsızlığı belirtileri ve bulgularında iletişim kurmak için gerekli sözel becerilere sahip değildir. Genellikle, bir GI bozukluğunun OSB olan bir çocukta meydana geldiğinin tek göstergesi bir davranış değişikliği veya patlamadır (Buie vd., 2010). Tabii ki, her değişiklik veya davranışlardaki patlama GI disfonksiyon veya karın rahatsızlığı nedeninden kaynaklanmıyor. Tıbbi sağlayıcılar genellikle OSB olan çocuklarda davranış sorunlarının altta yatan bir GI bozukluğu nedeniyle olup olmadığını belirlemek için mücadele ediyor.

Ortaya çıkan kanıtlar beyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin daha iyi anlaşılması sadece OSB olan çocuklarda GI disfonksiyon belirlemenize yardımcı olmadığını, aynı zamanda potansiyel OSB için yeni tedaviler sağlamak olduğunu göstermektedir. Son olarak bu makalede beyin-bağırsak-mikrobiyom etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasının OSB ile ilişkili GI ve/veya davranış bozuklukları için yeni tedavi terapilerine nasıl yol açabileceğini araştırılacaktır.

1. 3. OSB'de Fonksiyonel Gastrointestinal Bozukluklar

OSB'li çocuklarda GI semptomlarının potansiyel nedenleri açısından prospektif olarak değerlendirilen bir çalışmada, OSB'li çocuklarda GI şikayetlerinin çoğunun fizyolojik veya organik nedenlerden değil, fonksiyonel nedenlerden kaynaklandığını göstermektedir (Gorrindo vd., 2012). Gorrindo ve ark. OSB'li 40 çocuk ve GI şikayetleri ile nörotipik gelişimi olan 36 çocuğu topladı. Pediatrik GI uzmanları tarafından yapılan değerlendirmede, her iki grupta da GI şikayetlerinin en sık nedeni fonksiyonel GI bozuklukları (FGID) olduğu bulunmuştur. OSB grubunda 40 çocuktan 37'sinde FGID saptandı. Fonksiyonel kabızlık OSB çalışma grubunda en sık görülen GI bozukluğu oldu. Pediatrik uzmanların konsensus bildirimleri ve uygulama önerileri, OSB'li çocuklarda GI semptomlarının çoğunun nörotipik gelişimi olan çocuklarda görülenlere benzer fonksiyonel bozukluklardan kaynaklandığını ve OSB'ye özgü fizyolojik bir duruma bağlı olmadığını daha da desteklemektedir (Buie vd., 2010; Buie vd., 2010b; Furuta vd., 2012)

Organik veya fizyolojik bir hastalığın GI semptom(lar) nedeni olduğu tespit edildiğinde FGID tanısı konur (Rasquin vd., 2006; Hyman vd., 2006). Yayınlanan raporlar, OSB’li çocukların ebeveynleri tarafından bildirilen en sık GI semptomlarının karın ağrısı ve dışkı paternlerinin değiştirilmesi olduğunu göstermektedir. (Buie vd.,2010b; Gorrindo vd., 2012; Ibrahim vd., 2009; Mazurek vd. 2013). Karın ağrısına ve dışkı düzenini değiştirebilen FGID’ler fonksiyonel karın ağrısı, fonksiyonel kabızlık, irritabl barsak sendromu ve fonksiyonel dispepsi gibi çeşitli rahatsızlıkları içerir (Hyman vd.; 2006Rasquin vd., 2006).

Anormal dışkı paternleri ve karın ağrısı varlığına dayanan FGID’ler anormal davranışlar, duyuşal tepkiler ve uyku düzeni gibi beyinbağırsak etkileşimlerinin belirtileri ile yakından ilişkilidir (Jarrett vd. 2000; Mazurek vd. 2013; Waters vd., 2013; Walker vd., 1989;). Bozulmuş beyin-bağırsak fonksiyonu belirtileri sadece yaygın OSB olan çocuklarda meydana gelmez, aynı zamanda OSBpopölasyonda GI semptomlarının artan insidansı ile ilişkilidir. Mazurek ve ark. GI belirtileri olmayan OSB vakaları ile karşılaştırıldığında karın ağrısı, kabızlık veya ishal ile başvuran OSB’li çocuklarda anksiyete davranışlarında ve duyuşal responsitte artış saptanmıştır (Mazurek vd. 2013). Peters ve ark. OSB’li çocukların artmış katı kompulsif davranışlarında kabızlık ve tuvalet sorunları olma olasılığının daha yüksek olduğunu buldular (Peters vd., 2014). Maenner ve ark. OSB’li 487 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada GI semptomlarının muhalif davranışlar ve anormal uyku düzeni ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Maenner vd., 2012). İlginçtir ki, Maenner ve ark. ayrıcaOSB’li çocuklarda muhalif davranışların ve uyku bozukluklarının o kadar yaygın olduğunu buldular ki, onların varlığı GI bozuklukları için OSB’li çocukların taranmasında sınırlı bir yarara sahip.

Bozulmuş beyin bağırsağı fonksiyonu ve GI disfonksiyonu belirtileri arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır. GI bozuklukları nörotipik çocuklara göre OSB’de daha sık ortaya çıkmıştır. Daha fazla çalışma bozulmuş beyin-bağırsak etkileşimlerinin OSB olan çocuklarda nasıl GI bozukluklarına yol açabildiğini onaylamak için gereklidir.

1.4. Belirgin OSB Mikrobiyomu Kanıtı

Aslında, bağırsak bakterileri için bir rol tanımlamaya artan ilgi MSS hastalığı ve tersi için terim olarak beyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Şekil 3). OSB'li çocuklarda nörotipik kardeşler ve/veya sağlıklı kontrollere göre çeşitli bakteriyel organizmaların tipleri ve bileşimleri arasındaki farklılıklar bildirilmiştir (De Angelis vd., 2013; Finegold vd., 2010; Kang vd., 2013; Wang vd., 2013; Williams vd., 2011;). Bu çalışmalar sayesinde farklı mikrobiyomların çeşitli OSBpopülasyonları ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar sağlanmıştır.

İki çalışmada OSB popülasyonları ile ilgisiz sağlıklı kontroller arasında bakteri bileşiminde farklılıklar tespit edilmiştir (Kang vd., 2013; Wang vd., 2013; De Angelis vd., 2013). Kang ve ark. raporlarında OSB deneklerinde mikrobiyom (n=20) daha az çeşitli ve *Prevotella*, *Coprococcus* ve sınıflandırılmamış *Veillonellaceae* nörotipik çocukların mikrobiyomu ile karşılaştırıldığında daha düşük seviyelere sahip (n=20) (Kang vd., 2013). De Angelis ve ark. ayrıca OSB'li çocuklar (n=10), yaygın gelişimsel bozuklukaksi belirtilmeyen (n=10) ve nörotipik çocuklar (n=10) arasında bağırsak mikrobiyal farklılıkları keşfetti (De Angelis vd., 2013). OSB tanısı alan çocukların mikrobiyomu, nörotipik gelişimi olan çocukların mikrobiyomu ile karşılaştırıldığında *Sarcina*, *Clostridium* ve *Barnesiella intestihominis*'in bolluğunu içermiştir (De Angelis vd., 2013). Tam tür varyasyonları bu iki çalışma arasında aynı olmasa da, bu bulgular OSB'li çocukların bağırsak mikrobiyomu ile nörotipik gelişimi olan çocuklar arasında belirgin farklılıklar olduğunu göstermektedir. Çalışma katılımcılarındaki GI fonksiyonu değerlendirilmediği için çalışmalar da OSB tanısından çok OSB'li çocuklarda mikrobiyal farklılıkların GI disfonksiyonu ile ilişkili olup olmadığını belirleyemedi.

Williams ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, OSB ve nörotipik çocuklar arasındaki bağırsak mikrobiyom varyasyonlarının OSB'li çocuklarda GI disfonksiyonuna bağlı olup olmadığını, OSB ile ilişkili belirgin bir mikrobiyom bileşimine bağlı olduğunu öne sürmektedir (74). OSB (n=15) ve nörotipik gelişim (n=7) olan çocuklarda çeşitli GI bozukluklarının klinik değerlendirmesinin bir parçası olarak kolonoskopi sırasında alınan intestinal biyopsilerin değerlendirilmesi bu iki grup çocuk arasında mikrobiyal farklılıkları saptadı. OSB'li çocukların

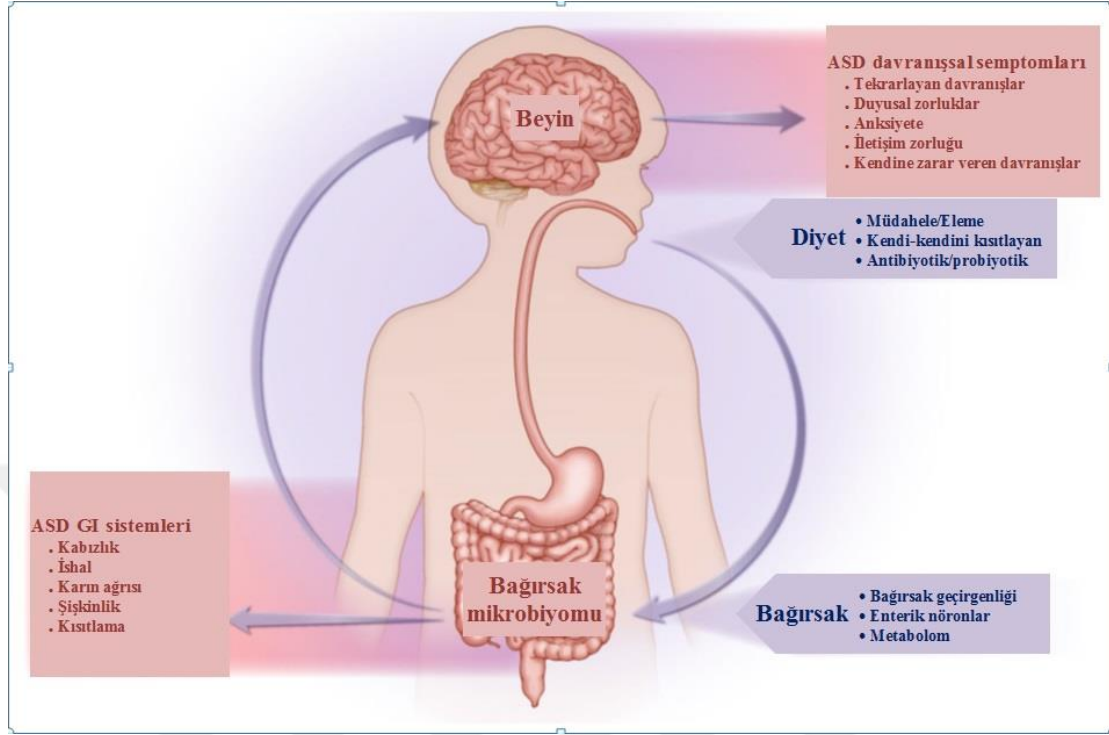
mikrobiyomu *Sutterella*'da bir artış da dahil olmak üzere, Bakteroidetlerin nispi olarak bolluklarında azalma ve OSB'de göreceli olarak artan Firmicutes ve Proteobacteria bolluklarını gösterdi (Williams vd., 2011). Bu OSB ve nörotipik çocuklar arasındaki mikrobiyom farklılıklarının GI disfonksiyonundan bağımsız kendine özgün bir şekilde olduğunu göstermektedir.

Mikrobiyomdaki diğer çalışmalar, mikrobiyomun FGID'li ve FGID'siz OSB'li çocuklar arasında farklılık gösterebileceğini göstermektedir (Buie vd., 2010). Williams ve ark., Wang ve ark. ayrıca *Sutterella* sp.'nin OSB'li çocuklardan alınan dışkı örneklerinde (n=23) tipik olarak gelişmekte olan kardeşlerden (n=22) ve ilgisiz nörotipik çocukların (n=9) dışkı örneklerinden (n=9) fazla olduğu bulundu (Kang vd., 2013). OSB ve FGID (n=9) olan çocuklarda OSB'li ve GI semptomları olmayan çocuklara göre *Ruminococcustorques*'de artış saptandı (n=14) (Wang vd., 2013). Bu bulgular OSB'li çocuklarda benzersiz mikrobiyal paternlerin mevcut olabileceğini ve OSB ve FGID'li çocuklarda daha fazla mikrobiyal farklılık olabileceğini düşündürmektedir.

Daha fazla çalışma gerçekten OSB'da farklı bir mikrobiyom karakterize edilebilir olup olmadığını belirlemek için gereklidir. 2010 yılında Finegold ve ark. 33 OSB'li çocuk, 7 etkilenmemiş kardeş ve 8 sağlıklı kontrol grubunda inceleme yaptı (Finegold vd., 2010). Williams ve ark. biyopsi tabanlı çalışma ile çelişen bulgularda sonuç olarak artan Bacteroidetes ve azalmış Firmicutes bileşimi ile OSB'de artan bakteriyel çeşitlilik olduğunu önerdi (Finegold vd., 2010; Williams vd., 2011). Daha fazla çelişki Gondalia ve ark. ve Son ve ark. etkilenmemiş kardeşleri ile karşılaştırıldığında OSB'li çocukların bağırsak mikrobiyomlarında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Gondalia vd., 2012; Son vd., 2015). Bu çalışmaların hiçbirinde, OSB çocuklarıyla ilişkili mikrobiyal farklılıkları tespit eden çalışmalarda olduğu gibi, nörotipik gelişimi olan bir grup alakasız çocukların dahil olmadığı unutulmamalıdır.

Mikrobiyal bileşimin OSB'li çocuklarda farklılık gösterip göstermediğini ve bu popülasyonda GI semptomları olanlarda daha da farklı olup olmadığını belirlemek için daha büyük ve iyi tasarlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar farklı bir OSB mikrobiyomunu doğrularsa, o zaman belirli mikrobiyom

farklılıklarının bilinmesi OSB’li çocuklarda davranış sorunları ve/veya GI disfonksiyonu için yeni tedavi terapilerinin geliştirilmesine yol açabilir.



Şekil 1.2: Mikrobiyota Bağırsak Beyin Eksenini İki Yönlü Etkileşim (Luna vd., 2016)

Beyin bağırsak-mikrobiyom eksenini otizm spektrum bozukluğunda kritik bir rol oynamaktadır. Otizm spektrum bozukluğu (OSB) yaygın olarak hem davranışsal semptomlar (örneğin, tekrarlayan ve/veya kendi kendine zarar veren davranışlar) hem de gastrointestinal (GI) semptomlar (örn., karın ağrısı) ile karakterizedir. Diyet ve antimikrobiyal kullanım da dahil olmak üzere çeşitli faktörler bağırsak mikrobiyomunu etkileyebilirken, enterik ve merkezi sinir sistemlerinin birbirine bağlılığı, pediatrik OSB’de hem davranışsal hem de GI semptom tezahürünü etkileyebilir.

1. 5. Terapötik Mikrobiyoloji Tedavi Stratejileri İçin Kanıt

Beyin-bağırsak-mikrobiyom etkileşim çalışmaları bağırsak mikrobiyomu manipülasyonu yoluyla OSB davranışları ve komorbid koşulları tedavi için umut sağlar. Hem hayvansal hem de klinik çalışmalar, bağırsak mikrobiyomunu değiştiren tedaviler uygulayarak nörolojik fonksiyon ve davranışlarda değişiklikler rapor eder (Messaoudi vd., 2011; Bravo vd., 2011). Probiyotiklerin hayvan davranış

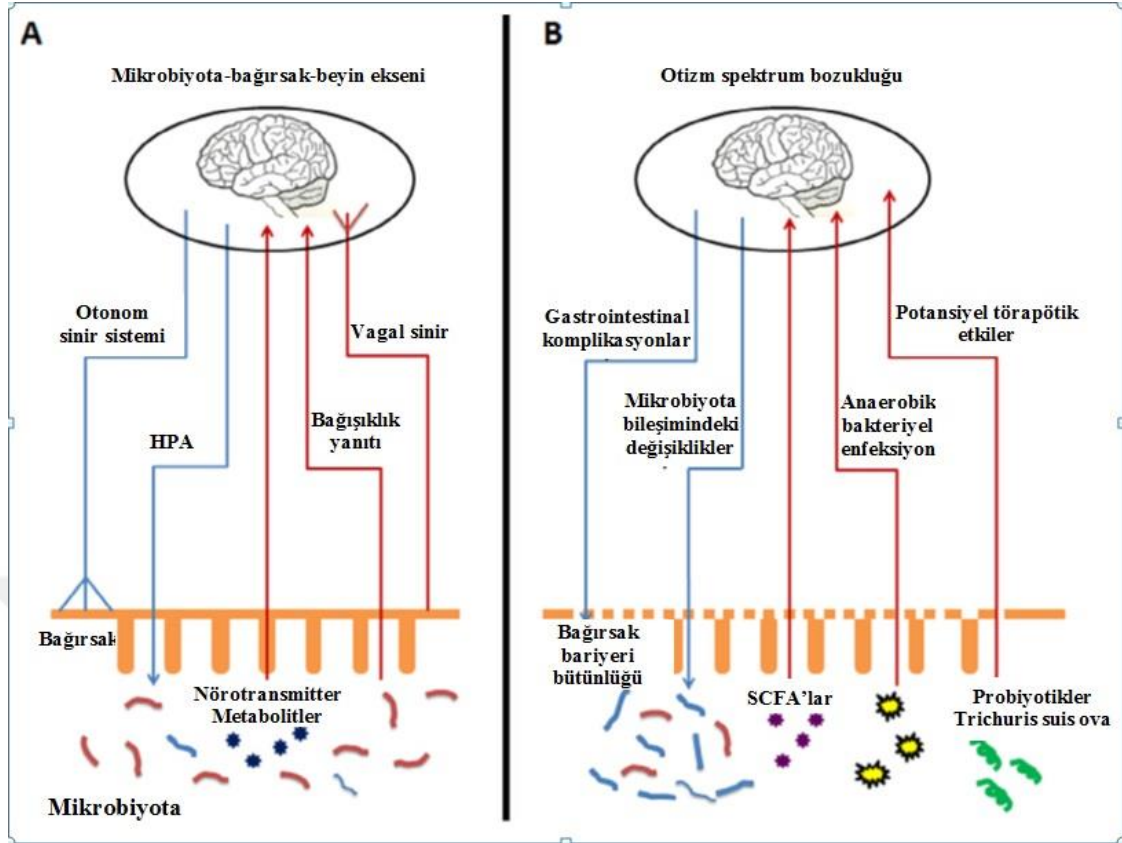
modellerinde kullanımı bağırsak bozukluklarında iyiye doğru değişiklik olduğuna dair kanıt sağlar, mikrobiyom, anksiyete ve depresyon ile ilişkili davranışları iyileştirebilir (Şekil 4) (Bravo vd., 2011; Messaoudi vd., 2011). Messaoudi ve ark. *Lactobacillus helveticus* ve *Bifidobacterium longum*'un probiyotik formülasyonunun anti-anksiyete ajanlarını taramak için tasarlanmış yerleşik bir sıçan modelinde anksiyete davranışlarını azalttığını bildirmiştir (Messaoudi vd., 2011). Bravo ve arkadaşları *Lactobacillus rhamnosus*'un fareler tarafından yenilmesinin anksiyete ve depresyona bağlı davranışların azalmasına yol açtığını ve duygusal davranışlardaki değişikliklerin vagal sinir sinyalinin aracılık ettiği merkezi GABA reseptör ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğunu buldular (Bravo vd., 2011). Bu çalışmalar bağırsak mikrobiyom manipülasyonu ile potansiyel anormal davranışların tedavisinde yardımcı olmak için kullanılabilir kanıt sağlar.

Bu potansiyel hayvanlardaki OSB fenotiplerinin patogenezinde beyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin rolünü vurgulayan ve mikrobiyomun manipüle edilmesinin birçok OSB davranışını nasıl tersine çevirdiğini vurgulayan raporlarla daha da desteklenir (de Theije vd., 2014; Hsiao vd., 2013; Clarke vd., 2012). Otizmin maternal bağışıklık aktivasyon modelini kullanan Hsiao ve arkadaşları sadece bu fare modeliyle ilişkili GI disfonksiyonunu değil, aynı zamanda bir probiyotik ile takviye edildikten sonra GI disfonksiyonunun görünür düzeltilmesini ve bu durumda *Bacteroides fragilis*'i belgeleyebildiler (Hsiao vd., 2013). Ancak bu çalışmanın en zorlayıcı sonuçları anksiyete, sensorimotor kapılar, tekrarlayan davranışlar ve iletişimde iyileşmenin görüldüğü davranışsal semptomlar üzerindeki etkisidir (Hsiao vd., 2013).

Hayvan çalışmalarında bulguların OSB'li çocuklara dönüştürülüp çevrilemeyeceği henüz bilinmemekle birlikte, OSB dışı popülasyonlarda yapılan klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar probiyotiklerin karın ağrısını hafifletebileceğini, stresli uyaranlara verilen tepkileri değiştirebileceğini ve beyin aktivitesini değiştirebileceğini göstermektedir (Kortnerink vd., 2014; Tiequn vd., 2015; Tillisch vd., 2013). İki yeni metaanalizler probiyotiklerin karın ağrısı ile ilgili FGID olan çocuk ve ergenlerin tedavisinde plaseboda daha etkili olduğunu buldu, özellikle irritabl barsak sendromu olan hastalar açısından (Kortnerink vd., 2014; Tiequn vd., 2015). FGID tedavisinde ek olarak, probiyotiklerin sağlıklı gönüllülerde

psikolojik sıkıntıları hafifletmeye yardımcı olduğu bulunmuştur (Messaoudi vd. 2011). Mikrobiyom değişikliklerinin doğrudan beyin fonksiyonlarını nasıl etkilediğini gösteren umut verici bilgileri fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme ile sağlıklı kadınlar tarafından bir probiyotik ile fermente süt ürününün 4 haftalık alımı ile merkezi duyu ve his kontrolü beyin bölgelerinin aktivitesini etkilemesiyle Tillisch ve ark. Gösterdi (Tillisch vd., 2013).

Çalışmalar OSB için bir tedavi olarak beyin-bağırsak-mikrobiyom etkileşimlerini hedeflemeyi desteklerken, OSB olan çocuklarda bağırsak mikrobiyomu değiştirmek için yöntemler geliştirilmesi ve kullanılmasında istihdam edilmelidir. Kanıtlanmamış veya eksik bulgulara dayalı olarak OSB için yeni tedaviler geliştirmeye çalışan insanlar çocuklar ve aileler için önemli zararlar göstermiştir (James vd., 2015). Yanlış bilgi ve tıbbi kanıt eksikliğinden kaynaklanan aşılardan ve şelat ağır metallerden kaçınma çabaları ölümlere yol açmış ve halk sağlığı krizlerine yol açmıştır (Pegorie vd., 2014; Brown vd., 2006). Şu anda, mikrobiyomu değiştirmenin diyet müdahaleleri kullanımı gibi, probiyotik takviyesi, antimikrobiyaller ve dışkı mikrobiyota nakli gibi yolları vardır (Frye vd., 2015). Diyet ve probiyotikler OSB dahil rutin çeşitli bozuklukların tedavisinde kullanılır. Bir sağlık kuruluşu veya diyetisyen gözetiminde uygun şekilde yapılan bu müdahaleler çocuklar için çok az risk oluşturmaktadır. Ancak, antimikrobiyallerin (antibiyotikler ve antifungal ilaçlar) kullanımı ve fekal mikrobiyota nakli önemli risk taşırlar (Aroniadis vd., 2013; Sandler vd., 2000). Bir çocukta ilaca dirençli bakterilerin geliştirilmesi ve yaşamı tehdit eden enterik patojenlerin tanıtılması gibi advers reaksiyonlar, OSB'li çocuklarda bu tedavileri uygulamadan önce klinisyenlere ve ailelere ara vermelidir (Aroniadis vd., 2013; Sandler vd., 2000). Beyin-bağırsak-mikrobiyom etkileşimleri hakkında çok daha fazla bilgi güvenli bir şekilde belirli tedaviler geliştirmek için gereklidir. Daha ileri çalışmalar beyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin belirli OSB ilişkili değişiklikler kurmak ve mikrobiyom fonksiyonu değişiklikleri OSB olan çocuklar için yararlı terapötik sonuçları sağlamasını değerlendirmek için gereklidir.



Şekil 1.3: Mikrobiyota-Bağırsak-Beyin Eksenini ve Otizm Spektrum Bozukluğunda Potansiyel Rolü. (Li ve Zhou, 2016).

(A) Mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini içindeki çift yönlü iletişim esas olarak otonom sinir sistemi (ANS), HPA eksenini, nöroendokrin ve nöroimmün yollar yoluyla gerçekleşir. (B) OSB patolojisinde mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini içindeki bozuklukların tezahürleri. Otistik bozukluklar gastrointestinal semptomlar ve bağırsak mikrobiyotasındaki kompozisyon değişiklikleri ile ilişkilidir. Tersine, bağırsak mikrobiyotasından ve bağırsak anaerobik bakteri enfeksiyonundan türetilen zararlı metabolitler OSB gelişimine katılabilir. Probiyotikler ve *Trichuris suis ova* (TSO) gibi mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini modülatörlerinin, OSB'de potansiyel terapötik etkiler gösterilmiştir. HPA: hipotalamus-hipofiz-adrenal; KZYA'leri: Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA, Short chain fatty acids)

1.6. Beyin-Bağırsak-Mikrobiyom Araştırmasının Gelecekteki Yönelim Ve Potansiyelleri

Mikrobiyomun gelecekteki çalışmalarının metabolomu, yani mikrobiyoloji tarafından üretilen amino asit ve kanda bulunan ve kanda atılan antioksidanlardaki değişiklikler gibi metabolitleri de dikkate alması gerekir. İdrar örneklerindeki amino asitleri ve antioksidanları analiz eden çalışmalar OSB çocukları ile sağlıklı kontroller arasındaki bakteri metabolitlerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir (Cozzolino vd., 2014; Emond vd., 2013; Mavel vd., 2013; Ming vd., 2012; Yap vd., 2010). Bugüne kadar bu iki popülasyon arasındaki dışkı metabolomunu karakterize etmek için yalnızca bir rapor denendi ve ilginç bir şekilde bu çalışma yaygın gelişimsel bozukluk-NOS tanısı olan çocuklarda serbest amino asitler ve uçucu organik bileşiklerin seviyelerinin belirgin şekilde etkilendiğini bulmuştur (n=10) ve otizm (n=10) ile sağlıklı kontrollere kıyasla (n=10) (De Angelis vd., 2013).

OSB ile ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesi hangi bireylerin veya spesifik popülasyonların hastalık gelişimi için risk altında olabileceğini daha iyi anlamayı sağlayacaktır. Hayvan çalışmaları bağırsağın başlangıçtaki bakteri kolonizasyonunun beyin gelişimini önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir (de Theije vd., 2014; Stilling vd., 2015).

Bağırsak bakterilerinden yoksun mikropsuz farelerin değerlendirilmesi amigdalada bazal nöronal aktivitenin arttığını, hipokampusta nörojenez üzerinde potansiyel etkileri, farelerin konvansiyonel ortama verildiğinde tamamen tersine dönmeyen ve bakterilerin GI kanallarını doldurmasına izin verilen değişiklikleri ortaya çıkardı (Stilling vd., 2015). Son raporlar ayrıca MSS nörotransmisyonunda ve hayvanlarda OSB fenotiplerinin patogeneğinde beyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin rolünü vurgulamaktadır (Alemi vd., 2013; Clarke vd., 2012; de Theije vd., 2014;).

OSB'nin erken saptanmasına ek olarak, beyin-bağırsak-mikrobiyom etkileşimleri ile ilişkili biyobelirteçler, OSB'li çocuklarda ortak morbid GI durumlarını teşhis etmek için bir yöntem sağlamaya yardımcı olabilir. Bu denekler genellikle sözlü olarak bozulmakta ve semptomlarını, özellikle karın ağrısını ifade edememektedir. GI

disfonksiyonu ve rahatsızlığı sıklıkla davranışlarda ani bir değişiklik veya provoke edilmemiş davranış patlamaları ile ortaya çıkar (Buie vd., 2010).

SonuçBeyin-bağırsak-mikrobiyom ekseninin gelecekteki çalışmaları büyük ölçüde OSB anlayışımızı artırabilir, örneğin GI semptomlarınınOSB’li çocuklarda neden bu kadar yaygın olduğunu açıklamak gibi. Ayrıca, çalışmadaki bu çizgi GI bozuklukları ve OSB ile ilişkili davranışsal sorunlar için tedavi için potansiyel hedefleri belirlemenize yardımcı olabilir. Son olarak GI disfonksiyonu ile ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesi ve OSB geliştirme riski ile önemli ölçüde şüpheli bir OSB tanısı olan bireylerin değerlendirilmesi için mevcut stratejileri etkileyebilir.

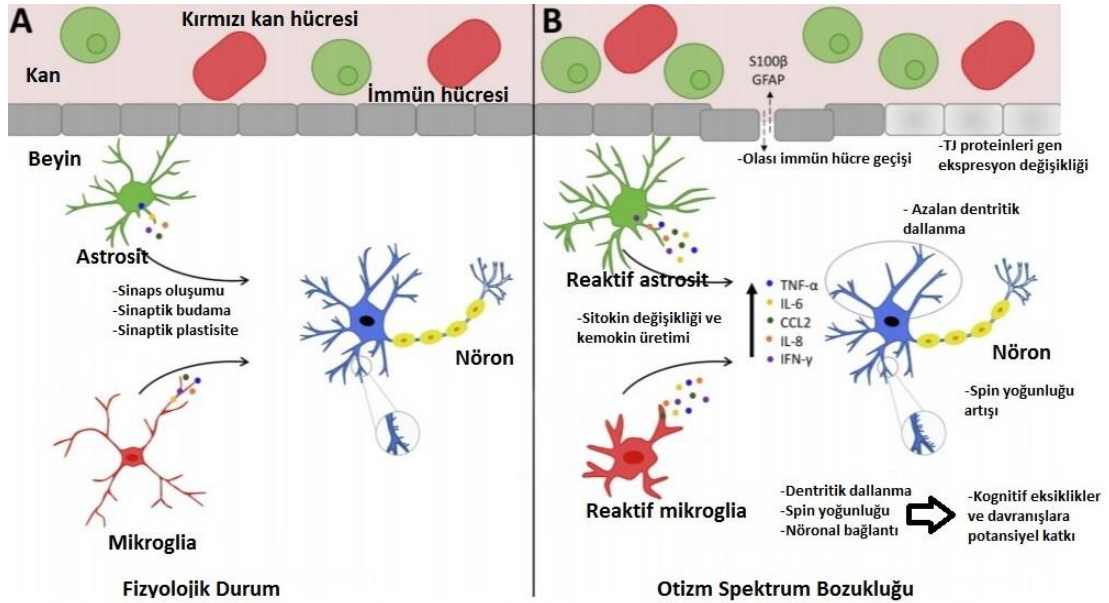
1.7. OSB Ve Nöro-İmmünopatoloji

Bağışıklık sistemi ve nöroinflamasyon OSB gelişiminde temel bir rol oynadığı görülmektedir (Poletaev vd., 2014). Bağışıklık, apoptotik nöronların giderilmesinin yanı sıra nöronal proliferasyonu, sinaps oluşumunu ve plastisiteyi düzenleyen, aynı zamanda birçok nörolojik aktiviteye aktif olarak katılan merkezi ve periferik sinir sistemlerinin nörogelişiminde önemli rol oynar (Ashwood vd., 2011b; Li ve Zhou, 2016; Wang vd., 2014). Son kırk yıl boyunca yapılan çeşitli çalışmalar, OSB tanısı konan bireylerde değişen bağışıklık yanıtlarını ele almaktadır (Estes ve McAllister, 2015; Hsiao vd., 2012). OSB'li birçok insan sıklıkla enfeksiyonlar, çevresel ve gıda alerjileri, astım, nöbetler, açıklanamayan cilt döküntüleri ve kalıcı bağırsak maya enfeksiyonları gösterir (Li ve Zhou, 2016; Sakamoto vd., 2015). Ayrıca, bağışıklık tolerans kaybı belirtileri, örneğin alerjiler, aşılarla / enfeksiyonlara aşırı tepki ve tanı konmamış otoimmün bozukluklar OSB tanısı konan kişilerde daha yaygın olarak ortaya çıkmıştır (Kern vd., 2014; Ruggeri vd., 2014; Wang vd., 2014). Bağışıklık sisteminin OSB'nin nörobiyolojik paternine dahil edilmesi şu anda yoğun bir araştırma konusudur(Bjorklund vd., 2016).

Nöroinflamasyon sürecinde T hücreleri sağlıklı beyinde işlev gören kan beyin bariyerini geçmektedir. Ancak bu geçiş enfeksiyon gibi durumlarda ve aktive-T hücre ile olmaktadır (Poletti vd., 2019). Aktive-T hücreler ilgili antijenle karşılaşınca çoğalır, endotel üzerinde etki eden sitokin ve kemokinleri üreterek diğer T hücreler,

B hücreler ve monositler gibi diğer lökositlerin kandan geçişini sağlamaktadır. Üretilen proinflamatuvar sitokinler aynı zamanda lokal mikroglia ve astrositlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive olmuş mikroglia ve astrositlerin ürettiği ek proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve proteazlar inflamatuvar cevabı arttırmaktadır (Ojo vd., 2019). Artan perivasküler inflamasyon kan beyin bariyerini bozarak inflamatuvar hücrelerin geçişini arttıran bir döngüye ve parankim hasarına yol açmaktadır. İnflamasyonun oluşumuna aracılık eden Aktive T hücreleri merkezi sinir sisteminde ilgili antijene rastlamaz ise kana, lenfatik sisteme dönebilir veya apoptoza uğramaktadır (Matta, vd., 2019; Ojo vd., 2019; Poletti vd., 2019).

Normal fizyolojik koşullar altında, astrositler ve mikroglia sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı ile sinapsların oluşumu ve budama yanı sıra plastisiteyi düzenlemektedir. OSB'li bireylerde kan beyin bariyerindeki bozulmalar, bağışıklık hücrelerinin alımı ve reaktif astrosit ile beyindeki glial fenotipik değişiklikleri ve sitokinlerin ve kemokinlerin artmış salgılanmasını tetiklemektedir. Meydana gelen değişiklikler sinaps oluşumu, budama ve plastisite gibi süreçleri bozmakta ve nöronal dendritik dallanma ve omurga yoğunluğunu, belirli beyin bölgelerinin yetersiz ve spin yoğunluğunu ve nöronal bağlantıyı değiştirmektedir (Şekil1.4) (Matta vd., 2019).



Şekil1.4: Otizm Spektrum Bozukluğu ile Meydana Gelen Nöroenflamasyon Süreci (Matta vd., 2019).

Bireylerde CD4+ T+ yardımcı hücrelerin, daha düşük T hücresi sayısının (CD2+ hücreleri) ve daha düşük yüzdelerin ve toplam lenfosit sayısının azalmaktadır (Ashwood vd., 2011b; Lopez vd., 2016; Warren vd., 1990; Yonk vd., 1990). Ayrıca, CD4+ T hücre alt popülasyonları, baskılayıcı T hücrelerini uyarmaktan sorumlu olan CD4RA+ T hücrelerinde bir azalma görülmektedir (Ahmad vd., 2017; Yonk vd., 1990). OSB'li bir ikiz modelinde CD4+ depresyonu, diğer nörolojik komorbiditelerle ilişkili interferongama (IFN- γ) ve interleokin-17 (IL-17) üretiminde bir düzensizlik belirlenmiştir (Magid vd., 2015). CD4+ T hücresindeki azalma OSB'de sık rastlanan bir bulgudur. Azalmış sayıda CD4+ Thücresi ve yardımcı hücresi (CD4+, CD8) olan OSB hastalarının yaklaşık %35'inde T lenfositlerinde anormallikler bildirilmiş, CD4 / CD8 oranlarını değiştirmiş ve baskılayıcı sayısını arttırmıştır (Gupta vd., 1996; Gupta vd., 1998). Bunu desteklemek için, yapılan çift kör bir çalışma, güçlü opiat antagonisti naltrekson ile tedaviyi takiben OSB çocuklarının %56'sında otistik semptomlarda önemli bir azalma olduğunu bildirmiştir. İlaç, T yardımcı indükleyicilerinin sayısını arttırmış ve T - sitotoksik baskılayıcıların sayısında azalma, bu da CD4 / CD8 oranının normalleşmesine neden olmuştur. Son zamanlarda yapılan girişimler, bağışıklık bozukluğu örüntüsü üzerinde stres yaratan bir hayvan otizm modeli geliştirmeye çalışmıştır (Scifo vd., 1996). Maternal bağışıklık aktivasyonu (MIA) uygulanan fare modellerinde annelerin yavruları, bağışıklık profilleri değişmiştir (Hsiao vd., 2012). İmmünolojik değişiklikler, CD4+, TCR β (+) Foxp3 (+) CD25 (+) T düzenleyici hücrelerinde bir eksiklik, artan CD4 aracılı IL6 ve IL - 17 üretimini ve anormalliği olan artmış periferik Gr- (1) + hücrelerini arttırmıştır. Işınlanmış fareler MIA farelerinden bağışıklık hücreleri ile yeniden doldurulduğunda, bağışıklık fonksiyonunun uzun süre yeniden programlanmasını etkileyen bireyin periferik bağlamının varlığını destekleyen kanıtlar sağlayan bağışıklık fenotipini geri yüklememiştir. Bununla birlikte, basmakalıp ve tekrarlayan tutumlar ve anksiyete benzeri davranışlar sergileyen ve kontrol veya MIA kaynaklı bağışıklık popülasyonları ile nakledildiğinde, normal bir davranışsal ve nörolojik patern sergileyen, OSB arasında temel bir ilişki gösteren, daha önce ışınlanmış, davranışsal olarak anormal MIA türevi yavrular ve bağışıklık düzensizliği tespit edilmiştir(Hsiao vd., 2012).

1. 8. Otizm İmmüno-Patolojisinde Rol Oynayan Elemanlar

1.8.1.T Hücreleri

T hücreleri, lenfositlerin bir alt kümesini oluşturur ve bağışıklık yanıtında önemli bir yere sahiptir. İmmünolojik açıdan CD4+ lenfosit yardımcı hücre aktiviteleri temel olarak Th1 (hücre aracılı bağışıklık) ve Th2 (humoral bağışıklık) ikiye ayrılır. Th1, öncelikle viral, mantarlar ve protozoalara karşı ilk savunma hattıdır. Th2 ise B hücrelerinin antikör üretmesine yardımcı olur (Hirahara vd., 2016; Moore vd., 2001; Rossignol, 2007). T1 hücresi yanıtının OSB'deki rolü, Th1, Th2 veya Th17 fenotip içeriğinde gözlenen bozukluklar, doğuştan ve edinilmiş bağışıklık ile ilişkilerinde bağışıklık düzensizliği, B hücresi vemajör sitokinlerin, örn. IL-1 β , TNFa, IL-2, IL-4, IL-13, IL-17 ve IL-10 ifadesi nedeniyle gündeme gelmiştir (Estes ve McAllister, 2016; Li vd., 2009; Molloy vd., 2006; Moore vd., 2001; Rossignol, 2007). Ayrıca, OSB'li bireylerde bir dizi anormal immün adaptif yanıt bildirilmiştir (Singh, 1996; Stubbs, 1995). Yapılan çalışmalar, yüksek IL-12 ve interferon üretimi ile Th1 sisteminin aktivasyonunu ortaya koymuştur (Ross vd., 2013). OSB'de IL-12, IL-1, IL-6, TNF-a, IL-23 ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi proinflamavatuvar sitokinlerin seviyesindeki değişiklikler bildirilmiştir (Ricci vd., 2013). OSB'li çocuklar artmış IFN γ ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) eksprese ederler, bu da Th1 eğriliğiyle sonuçlanır (Croonenberghs vd., 2002; Goines vd., 2011). Ayrıca, bireylerde TNF α 'nın arttırılmış T hücre üretimi ve azalmış IL-10 üretimi ile birlikte, hücre aracılı bağışıklık belirteçlerinin üretiminde bir artış gözlenmiştir (Ashwood vd., 2011b; Rossignol, 2007). Birçok çalışma OSB'li CD4 + hücre popülasyonunda Th1 hücrelerinden Th2 hücrelerine belirgin bir kaymaya sahip olduğunu göstermiştir (Ashwood vd., 2011b; Gupta vd., 1996; Gupta vd., 1998). Bu değişiklik OSB'de kronik viral enfeksiyonlara yatkınlığı arttırmaktadır (Croonenberghs vd., 2002). Ayrıca bireylerde immünoglobulin E (IgE) ve IL-4 üreten CD4+ T hücreleri ve düşük IL- 2 üreten CD2+ Thücreleri üretimine sahip olduğunu göstermiştir (Gupta vd., 1996; Gupta vd., 1998; Rossignol, 2007; Theoharides, 2013). T hücresi aracılı immün yanıtta bozukluk nedeniyle OSB'de bağırsak epitelyal bozukluğu ve bağırsak mikrobiyom bozukluğu da bildirilmiştir (Furlano vd., 2001; Luna vd., 2016). Bireylerin yaklaşık %5'inin IgA eksikliğine ve % 30-40'ının serum IgA düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Ashwood vd.,

2004; Gupta vd., 1996; Lau vd., 2013). Bireyler genellikle sağlıklı kişilere kıyasla artmış anti-gliadin antikorları ile glutene karşı gelişmiş bir duyarlılık gösterir (Rosenspire vd., 2011). OSB'de, özellikle regresif OSB'si olan çocuklarda, serumda immünoglobulin bileşiminde, düşük normal IgA ve B23 eksprese eden B23 hücrelerini içeren bir değişiklik gözlenmiştir (Wasilewska vd., 2012). Mukozal bağışıklık, düzenleyici T hücrelerini de etkilemektedir (Chirumbolo, 2015; Kinoshita ve Takeda, 2014). Th17 hücrelerinin mukozal bağışıklıktaki aktivitesi, bu bağlamda ve mukozal bağışıklık toleransında D vitamininin rolü ile de ilişkilendirilmiştir (Al-Ayadhi ve Mostafa, 2012; Cannell, 2013; Saad vd., 2016). Yapılan deneysel modellerde bozulmuş Th17 fonksiyonu ile OSB arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Choi vd., 2016). OSB'li çocuklar, eşlik eden astım ile birlikte artmış miktarda IL - 17 ve IL - 17a eksprese ederler (Akintunde vd., 2015; Al-Ayadhi ve Mostafa, 2012). Bu nedenle IL - 17'nin OSB'deki rolü önemli ilgi çekmektedir (Cabanlit vd., 2007; Connolly vd., 2006). Son olarak, beyin proteinlerine reaktif antikorlar üretebilen otistik bir "endofenotip" tipik karakterize edici özelliği, 1) proenflamatuar sitokinler ve IL <10 üreten bağışıklık hücrelerinin varlığı ve artışı; 2) CD8 + saf (CD45RA + / CCR7 +) T lenfositleri ve CD8 + efektör bellek (CD45RA- / CCR7-) hücrelerinde bir artış ve ayrıca 3) CD4 + terminal olarak farklılaşan (CD45RA- / CCR7 +) bir azalma bir immünolojik paterne sahip gibi görünmektedir (Saresella vd., 2009). Bu veriler ayrıca OSB tanısı konan çocuklarda adaptif immün yanıtlarda önemli değişiklikleri desteklemektedir.

1.8.2. B Hücreleri

B hücresi, humoral bağışıklık yanıtında büyük bir rol oynayan lenfositlerdir. İnsan vücudu her gün milyonlarca farklı B hücresi tipi üretir ve her tipin zarında belirli bir antijene bağlanabilecek özel (özgün) bir reseptör proteini vardır. İnsan vücudunda kan ve lenfte milyonlarca B hücresi antikor üretmeden dolaşır. Herhangi bir B hücresi antijen ile karşılaştığında ve bir yardımcı T hücresinden ilave sinyal aldığı anda; aşağıda tanımlanan iki farklı B hücresi tipinden birine farklılaşır. B hücreleri doğrudan bu hücre tiplerinden birine dönüşebilecekleri gibi, bir ara adımdan sonra da dönüşebilirler. OSB tanısı konan çocukların kan hacmi başına yaklaşık %20 ila 25 arasında artan mutlak B hücresi sayısına sahip olduğu

bildirilmiştir (Ashwood vd., 2011; Heuer vd., 2008). Yapılan bir araştırma, CD157 veya kemik iliği stromal hücre antijeni-1 (BST-1), özellikle rs10001565'teki CT genotipi, tek nükleotid polimorfizmindeki (SNP'ler) değişkenliğin, OSB'li bireylerle ilişkili olduğunu, ve böylece OSB'de bozulmuş bir B hücre popülasyonu olasılığını gösterir (Yokoyama vd., 2015). Hem CD38 hem de CD157'nin T ve B hücrelerinde doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkisini modüle ettiğini belirtmek ilgi çekicidir. OSB'li kişilerde, B hücrelerindeki mitokondriyal disfonksiyon, OSB'deki B lenfositlerinin neden OSB başlangıcı ile ilişkili östrojen, dihidrotestosteron ve hormon rahatsızlıklarına farklı bir bağışıklık tepkisi sergilediğini açıklamaktadır (Malavasi vd., 2006). Thimerosal için dış uyaranlara B hücresi duyarlılığı da bildirilmiştir. OSB'li bireylerde azalmış sayıda B - hücresi ve artan miktarda NK hücresi görülür. Bu kanıtlar, OSB'de gözlenen immünoglobulin düzeylerindeki azalmanın B hücresi tükenmesinin veya bozulmasının bir sonucudur (Heuer vd., 2008; Sharpe vd., 2013).

1.8.3. Periferik Monokluat Hücreler

Monositler, çevre dokulara göç ettikten sonra makrofajlara ayrılır. Makrofajlar da patojenleri fagositize eder ve lenfositlere antijenler sunar (Berdowska vd., 2001; Sweeten vd., 2003). IFN γ tarafından uyarıldığında, monositler ve makrofajlar artmış miktarda neopterin üretir. Yüksek seviyelerde neopterin, monosit / makrofaj aktivasyonunun yanı sıra T hücrelerinin aktivasyonunun ve hücre aracılı bağışıklığın bir göstergesidir (Berdowska vd., 2001; Zhao vd., 2015). OSB'de daha önce yapılan çalışmalar, sağlıklı kontrollere göre OSB'deki toplam lökositlerle ilişkili olarak biraz daha fazla sayıda mutlak monosit sayısı ve önemli ölçüde daha yüksek monosit yüzdesi ortaya koymuştur (Denney vd., 1996; Sweeten vd., 2003). Ayrıca, bu monositler üzerindeki aktivasyon belirteçlerinin arttırılmış ekspresyonu, bu hücrelerin aktive edilmiş bir durumda olduğunu düşündürmüştür (Ashwood vd., 2011). OSB araştırmalarında sorulması gereken temel bir soru, OSB'deki nöroimmün değişikliklerin etkisidir (Gottfried vd., 2015; Siniscalco, 2015). Yapılan araştırmalarda OSB'de doğuştan gelen bağışıklıkta immünolojik bozukluk gözlenmiştir. Periferik kan monositlerinin, TLR2 ve TLR4 uyarana ve özellikle IL-6 ve IL-10'a yanıt olarak IL-1 β , TNF α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri

arttırdığı bulunmuştur (Jyonouchi vd., 2014; Jyonouchi vd., 2005; Manzardo vd., 2012). IL-6 ve IL-1 β üretiminin artması, OSB tanısı konan bireylerde artan sosyal davranışlarda bozulma ile ilişkili bulunmuştur (Enstrom vd., 2009). Doğuştan gelen bağışıklık OSB gelişiminde temel bir rol oynamaktadır. Doğuştan gelen bağışıklık ile ilişkili sitokinler ve kemokinler OSB'de kontrollerle karşılaştırıldığında değiştirilir ve bu moleküllerin OSB risk bağışıklık belirteçleri olarak kullanılabilmektedir (Masi vd., 2015; Li vd., 2015; Zerbo vd., 2016). OSB'de alternatif mRNA ekleme bozukluğu, monosit / makrofaj ve doğal öldürücü hücrelerde bazı bozulmaları açıklamaktadır (Stamova vd., 2013).

OSB'de proinflatuvar işaretlere rağmen son raporlar, OSB'li bireylerin TLR7/8'in aktivasyonundan sonra azalmış proinflatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-23), T hücresi mitojenleri (IFN- γ , IL-17 ve IL-12p40) ile uyaransız (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) TLR2 / 6 (IL - 6), TLR4 (IL-12p40) 12p40) ve Candida cinsinden antijenlerle (IL - 10 veya IL) 12p40) üretildiği periferik monosit / makrofajların sitokin paternine sahip olduğunu göstermiştir (Jyonouchi ve Toruner, 2012). Kannabinoid reseptörü tip 2 (CB2R) yoluyla bağışıklık tepkisini modüle edebilen bir sistemde yer alan endokannabinoid reseptörünün makrofajlarda ve mikroglia da yüksek oranda eksprese olmasına rağmen, fonksiyonunun OSB'li bireylerde bozulma gösterdiği tespit edilmiştir (Siniscalco vd., 2014). Lökosit reseptörlerinin yanı sıra birçok çözünür faktör OSB'de temel belirteçlerdir. Örneğin, beyin IL-6, OSB başlangıcında ve gelişiminde önemli bir nöroimmün aracı olarak kabul edilir. Makrofaj aktivitesi OSB'de de değişir (Wei ve Li, 2013). Başka bir örnek olarak, makrofajdan türetilmiş kemokinler (MDC) veya CCL22 ve timus ve aktive / regüle edilmiş kemokin (TARC) veya CCL17 gibi birçok CCR4 ligandının OSB'li çocuklarda kontrollere göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda makrofaj göçü önleme faktörü (MIF) için, MIF ve OSB için genetik promotörde fonksiyonel bir polimorfizm arasında genetik bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, MIF'nin OSB patogeneğinde önemli bir fonksiyonel rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Al-Ayadhi ve Mostafa, 2013; Grigorenko vd., 2008).

1.8.4. Doğal Öldürücü (Natural Killer NK) Hücreler

Doğal immüitenin elemanı olan doğal öldürücü (natural killer- NK) hücreler, kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. Bunun aksine T ve B lenfositleri esas olarak edinsel immün yanıtta rol alırlar. Patojenler ve tümörlere karşı spontan litik aktivite gösteren NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluşturur ve karaciğer, peritoneal kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunur. OSB'deki NK hücrelerindeki anormallikler, bireyleri kritik gelişim dönemlerinde otoimmünite ve olumsuz nöroimmün etkileşimlerin gelişimine yatkın hale getirir (Enstrom vd., 2010). Merkezi sinir sistemi (MSS) proteinlerine karşı otoantikorların varlığı, OSB'de yaygın bir bulgudur ve anormal NK hücresi aktivasyonu ile başlatılabilen OSB'li bireylerde devam eden bir inflamatuvar ve otoimmün sürecini yansıtır (Ashwood vd., 2006). Bu durumda, NK hücre sayılarının genişlemesi, muhtemelen homeostatik üretimin artması ve sitokinler gibi büyüme faktörlerinin aracılık ettiği yoğun bağışıklık / otoimmün yanıtlardan kaynaklanmaktadır (Ashwood vd., 2011).

Ashwood ve ark. yaptıkları çalışmada OSB tanısı konan çocuklarda mutlak NK hücresi sayısının yaklaşık% 40 daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Ashwood vd., 2011). Bu veriler, OSB tanısı konan çocuklarda kontrollere göre daha fazla sayıda NK hücresi ve NK hücresi ile ilişkili hücresele reseptörlerin ve efektör moleküllerin gen ekspresyonunun arttığını bildiren Enstrom ve ark. ile uyumludur (Enstrom vd., 2010). Bununla birlikte, Vojdani vd. (2008), OSB'li çocukların %45'inin in vitro stimülasyona karşı NK hücrelerinin yanıtlarında azalma olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle NK hücre sayılarındaki artış, NK hücre fonksiyon eksikliklerini telafi etmek için hücre sayılarını arttırmak için telafi edici bir mekanizma ortaya çıkarmaktadır (Ashwood vd., 2011). CD57+CD3- lenfositlerinin sayısının OSB'li çocuklarda klinik olarak kabul edilen aralığın altına düştüğü görülmüştür (Siniscalco vd., 2016). Ayrıca, OSB'li çocuklar KIR / HLA komplekslerini (aKIR / HLA) aktive eder, burada KIR, NK hücreleri üzerinde ifade edilen katil hücre bağışıklık globulin benzeri reseptördür, yani uteroda bu bağışıklık etkileşimleri OSB'de bağışıklık aktivasyonunu teşvik etmektedir (Guerini vd., 2014).

1.8.5. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler doğuştan gelen bağışıklığa aktif olarak katılır ve ayrıca adaptif bağışıklık tepkisini ve bağışıklık toleransını modüle eder. Bunlar, mikroplar üzerinde patojenle ilişkili moleküler patern molekülleri (PAMP) veya endojen dokuların hasara bağlı moleküler patern molekülleri tarafından hedeflenen birkaç doğal patern tanıma reseptörü (PPR) eksprese eden fagositik hücrelerdir (Breece vd., 2013; Steinman, 2007). Ligandarı bağladıktan sonra dendritik hücreler, göç hareketliliğini arttıran, diğer bağışıklık hücrelerini dönüştürmek için kemokinler üretir. Efektör T hücrelerinin uyarılması için komşu bağışıklık hücrelerini kontrol ederek büyük uyarıcı moleküller üreten ve büyük miktarlarda sitokin salgılayan olgunlaşma aşamalarını üstlenirler (Banchereau vd., 2000; Breece vd., 2013; Ueno vd., 2007). Miyeloid dendritik hücre sıklığı OSB'de artmaktadır. Lin1 BDCA1+CD11c + ve Lin1 BDCA3+ CD123 olarak tanımlanan fenotipli miyeloid dendritik hücreler ve Lin1 BDCA2+CD123+ veya Lin1 BDCA4+CD11c plazmositoid fenotiplerin OSB'deki gelişimsel gerileme ve amigdala hacmindeki artış ile ilişkili görüldüğü belirlenmiştir (Breece vd., 2013). Ayrıca, dendritik hücreler hem merkezi hem de periferik toleransın indüklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Çevredeki dendritik hücreler, silme, yanıt vermeme indüksiyonu veya uyarlanabilir T düzenleyici hücrelerin üretilmesiyle toleransı korumak için sınırlı veya yok ko-uyarımı olan düşük dozlu immünojenik olmayan antijenleri sürekli olarak yakalar ve sunarlar (Steinman, 2007). Breece vd. (2013), OSB teşhisi konan küçük çocuklarda kan miyeloid dendritik hücrelerinin dolaşım hızlarının arttığını tespit etmişlerdir. Bu artmış frekanslar, artmış amigdalar hacmiyle ve OSB'li hastalarda artmış tekrarlayan davranışlarla ilişkilidir (Breece vd., 2013).

1.8.6. İmmünoglobulin Değişikliği

OSB tanısı konan bireylerde immünoglobulin düzeylerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir. IgG ve IgM seviyeleri OSB'li bireylerde anormal seviyede artmış (Croonenberghs vd., 2002b) veya azalmış şekilde tespit edilmiştir (Croonenberghs vd., 2002; Gupta vd., 1996; Heuer vd., 2008). Anti-glutamik asit dekarboksilaz antikoru (anti-GAD) dâhil olmak üzere anti-nöronal antikorumların

serumdaki varlığı belirlenmemiştir (Bayram vd., 2016). OSB'li bireylerde plazma belirteçleri değerlendirilerek kazein, yumurta akı, yumurta sarısı ve yer fıstığına karşı serum IgG antikorlarında tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda OSB'li bireylerde 1p13.3 konumunda glutatyon S transferaz (GSTM) yokluğu ve glutatyon S transferaz I105V (GSTP1) yokluğunda polimorfizm ve OSB hastalarının mitokondriyal gen süperoksit dismutaz A16V (SOD2) genetik polimorfizm görülmüştür. (Esparham vd., 2015). Bu nedenle, beslenme, çevresel ve immünolojik faktörler OSB patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. OSB tanısı konan çocuklarda düşük seviyelerde immünoglobulin (IgG ve IgM) rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, önceki çalışmaların karşılaştırılmasında, farklılıklar farklı örneklem büyüklüklerine, OSB'li bireylerin medyan yaşına, kontrol numunesi türlerindeki farklılaşmaya ve farklı deneysel yaklaşımlara bağlanmaktadır (Heuer vd., 2008). Maternal bağışıklık globülinlerindeki değişiklikler ve otoantikorların varlığı da doğan bireylerde OSB'ye neden olmaktadır (Brown vd., 2015; Poletaev vd., 2014). OSB'de düzensiz antikorları anlamamızı artırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

1.8.7. Sitokinler Ve Kemokinler

Sitokinler ve kemokinler, bağışıklık veya hormon benzeri bilgilendirici aktiviteye sahip diğer somatik hücreler tarafından salgılanan küçük proteinlerdir. Komşu duyarlı hücrelerde modifikasyon indüklemeye yeteneğine sahiptirler. Bazı sitokinler proinflamatuvar olarak kabul edilir ve bağışıklık sisteminin hücrelerini enfeksiyon bölgesine almak için bir bağışıklık yanıtı sırasında uyarılır (Wang vd., 2014). OSB tanısı konan bireylerin sağlıklı kontrollere göre sitokin profillerinin değiştiği ve kronik sitokin indüksiyon durumunda olduğu gözlenmiştir OSB tanısı konan hastalarda azalmış Th2 antiinflamatuvar yanıtı ve Th1 proinflamatuvar sitokin yanıtı artar. Bu, Th1 yolağı yoluyla geliştirilmiş doğuştan gelen ve adaptif bir bağışıklık reaksiyonunu içerir ve lokalize beyin iltihabı ve otoimmün disfonksiyonun OSB'de yer alabileceğini göstermektedir (Ashwood vd., 2011a; Ashwood vd., 2011c; Wang vd., 2014). Elde edilen veriler doğrultusunda, OSB tanısı konan çocuklarda IL - 1 β , IL - 6, IL - 8 ve IL - 12p40, MCP - 1, RANTES ve eotaksin dâhil yüksek sitokinler tespit edilmiştir (Ashwood vd., 2011a; Ashwood vd., 2011c). Artmış

inflatuar aracilar IFN γ , MIF, trombosit kaynakli buyume faktoru - BB (PDGF-BB) ve IL-18'in duzensizligi OSB'li bireylerde anormal davranislarla iliskilendirilmistir (Ashwood vd., 2011a; Ashwood vd., 2011c; Grigorenko vd., 2008; Kajizuka vd., 2010; Singh, 1996). Hucrelerin bagisiklik duzensizligi de sitokinlerin islevini ve uretimini etkilemektedir (Businaro vd., 2016).

1.8.8. Otoantikoklar

Antikoklar organizmayi bakteri ve virus gibi patojenlere karşı savunur. Ancak bazı bozukluklarda bu antikoklar normal hucrelere de saldirarak otoimmun hastaliklari olusmasina sebep olabilir. OSB'li bireylerde beyine ozgu otoantikoklari yuksek duzeyi, hastaligin olasi otoimmun mekanizmasinin aydinlatilmasi gerekliligine isaret etmektedir. Otoantikoklar OSB'de cok sayida ve cesitli hedeflerde rol oynamaktadir. Inflatasyonun artmasi gizlenmis antijenleri ve epitop yayilmasini ortaya cikaran hucre sel hasara yol acmaktadir (Onore vd., 2012). OSB'li cocuklarda serebellar Purkinje hucrelerine ve diger norol proteinlere yonelik antikoklar dahil olmak uzere bir cok nörone ozgu antijene ve capraz reaktif peptitlere karşı yukseltilmis serum otoantikoklari bulunmustur (Onore vd., 2012; Wang vd., 2014). Birden fazla calisma OSB tanisi konan cocuklarda saglikli cocuklara kiyasla beyine ve merkezi sinir sistemine tepki gosteren yuksek sayida otoantikok tespit edilmiştir (Cabanlit vd., 2007; Wills vd., 2007). Yapilan calismalarda sadece beyne ozgu IgG otoantikoklari yuksek sıklıkta gorulmemis, aynı zamanda daha siddetli olan anti-nöron antikoklari yuksek sıklıkta belirlenmiştir (Cabanlit vd., 2007; Elamin ve Al-Ayadhi, 2014; Piras vd., 2014). OSB'li bireylerde beyin otoantikoklari yuksek kan cıva (BHg) seviyeleri, dusuk serum dokosaheksaenoik asit (DHA) seviyeleri ile de iliskilidir (Mostafa ve Al-Ayadhi, 2012; Mostafa vd., 2016a). Cocukluk Otizm Derecelendirme Olcegi (CARS) skorlari ile serum nörokinin A ve BHg duzeyleri arasında pozitif bir iliski bulmustur (Mostafa vd., 2016a). OSB'li cocuklarda yuksek Hg seviyeleri, Hg'ye maruziyetin artmasiyla iliskilidir, ancak aynı zamanda daha yuksek vucut yukune yol acan Hg salgilama yeteneginin azalmasinin bir sonucudur (Khaled vd., 2016). Artmis nörokinin A seviyeleri ile nöroinflamasyon, OSB'li bazı cocuklarda gorulur ve yuksek BHg seviyeleri ile kanitlanır. Ayrıca Pb, OSB'de nöroinflamasyon ve

otoimmüniteyi indükler (Mostafa vd., 2016b). OSB'li bazı çocuklarda artmış BPb düzeylerinin serum anti - ribozomal P antikorlarının üretimini tetiklemektedir (Mostafa vd., 2016b). OSB'li çocukların sağlıklı kontrollere göre kanda daha düşük çinko (Zn) / bakır (Cu) oranına sahip oldukları bildirilmiştir (Craciun vd., 2016; Faber vd., 2009; Li vd., 2014). OSB'si olan çocuklarda Hg birikiminin bir nedeni olarak metallotiyonin (MT) işlev bozukluğunun ortaya çıkabileceği ve aynı işlev bozukluğunun Zn eksikliğine de yol açabileceği öne sürülmüştür (Bjorklund, 2013). Çinko bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar ve Zn eksikliği olan hastalar çeşitli patojenlere karşı artan duyarlılık oluşturmaktadır. Hem eser elementler (veya ağır metaller) hem de otoantikorlar nöroenflamasyonun nedenlerindendir. Hamilelik sırasında fetal beyin gelişimi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilen maternal otoantikorların otoantikorlar fetüse ulaşır ve fetal beyin dokusunu etkiler (Croen vd., 2008; Zimmerman vd., 2007). Bu nedenle, beyne özgü maternal otoantikorların bazı nörolojik gelişimsel bozukluklarda bir etkisi mevcuttur. Ayrıca, OSB tanısı konulan bireylerde ailede sık tip 1 diyabet ve ülseratif kolit gibi otoimmün bozukluk öyküsü vardır (Wang vd., 2014; Zimmerman vd., 2007).

SonuçDünyada ve ülkemizde görülme sıklığı giderek artan OSB, hem sosyoekonomik hem de halk sağlığı açısından değerlendirilmesi gereken bir bozukluk olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalık belirtilerinin erken teşhisi, bireyin yaşam kalitesini arttırmakla kalmaz aynı zamanda ileride uygulanabilecek tedavi ve eğitim programlarını da olumlu yönde etkiler. OSB genetik, immünojenik, metabolik, mikrobiyom ve çeşitli çevresel faktörlerin etkisinde, heterojen bir hastalık olarak tanımlanabilir. Birçok nörodejeneratif ve otoimmün hastalığa benzer şekilde, OSB'nin patogenezinde de kemokinlerin ve sitokinlerin rol oynadığı sinyal bozukluklarının olduğu görülebilmektedir. Bunun yanı sıra, otistik hastaların T ve B lenfositlerinde, immünoglobulinlerinde ve NK hücrelerinde gözlenen fonksiyonel değişikliklerin, hastalık etiolojisinde önemli olabileceği düşünülmektedir.OSB'de uyku ve davranış bozukluklarının yanı sıra diyare, kabızlık, şişkinlik, reflü gibi GİS problemleri de sıkça görülmektedir. Özellikle antibiyotik kullanımı ile toksik maddeler üreten patojenlerin sayıca artması ve buna bağlı olarak bozulan mikrobiyota, bağırsak inflamasyonuna ve ESS bozukluklarına neden olabilmektedir. Bağırsaktaki artmış Clostridium türlerinin ürettiği güçlü nörotoksinler, bağırsak

bariyerinin bütünlüğünü bozarak istenmeyen maddelerin bağırsaktan geçişine neden olur. Bu maddelerin MSS'ye doğrudan veya dolaylı etkisinin, otistik davranışlar ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Günümüzde probiyotik tedaviler otistik davranışların tamamen ortadan kaldırılmasında yeterli olmamakla birlikte gelecekte OSB ve birçok nörodejeneratif hastalığın tedavi aşamalarında önleyici/ destekleyici olarak değerlendirilebilir. OSB'li bireylerin kan, idrar ve dışkı analizleri sonucu belirlenen potansiyel biyo belirteçler, hem OSB'nin etiyolojisinin anlaşılması için, hem de otizm semptomlarının hafifletilmesine yönelik yapılacak bilimsel çalışmalar için yol gösterici olabilir.

1.9. Otizm Ve Genetik

Geçmiş yıllarda ikizlerde yapılan çalışmalarda otizmin genetik yönü hakkında çok daha yüksek ihtimalli verileri paylaşılmış idi (%90'a kadar) (Bailey vd., 1995), ancak son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda otizm ile genetik ilişkisinin bu kadar güçlü olmadığı bildirilmiştir (Hallmayer vd., 2011; Wayne vd., 2018). Bu veriler arasındaki çelişki otizmin farklı subtiplerindeki yılların geçmesi ile etiyolojik etkenlerde görülebilen bilinmeyen değişiklikler ile ilgili olabilir (Wayne vd., 2018).

Otizm ile ilgili genetik son zamanlarda Honk Kong, Taiwan ve Çin'de yürütülen çalışmaları da içeren çeşitli çalışmalar farklı ülkelerde gerçekleştirilmiştir. Otizmde 600'den fazla gen çalışılmıştır ancak bunların pek çoğunun otizm üzerine etkisinin oldukça küçük olduğu belirlenmiştir (Chien vd., 2011; Siu vd., 2016; Wang vd., 2016; Warrier vd., 2015, Wayne vd., 2018). *Fragile X*, *SHANK3*, *CASPR2* gibi birkaç genlerin otizm ile ilişkisi iyi olarak anlaşılmış olmakla birlikte, günümüzde hala otizimli birçok vakalarda, genlerin otizm ilişkisi çok güçlü olarak ortaya konulamadığı gibi birçok bilinmeyen genetik faktörler hala keşfedilebilmiş de değildir. Bunların bir sonucu olarak da otizmin tanısında kullanılabilecek klinik genetik bir test de henüz geliştirilememiştir. *CNTNAP2*, *SHANK3* ile modellenmiş transgenik (knockout) fareler ile yapılan deneysel hayvan modelleme çalışmaları, otizmin tedavi yaklaşımlarında yeni opsiyonlar ile umut vaad etmektedirler (Wayne vd., 2018).

MECP2 gen mutasyonu, OSB'li hastaların % 4'ünde görülen tekrarlayan mutasyonlardan birisidir (Wang vd., 2016, Waye vd.,2018). *MECP2* Rett sendromlu (steriotipik el hareketleri, otizlerin bazı tipleri ile birlikte kognitif bozukluk ile karakterize ve sınırlı göz teması ve sosyalizasyon eksikliğini içeren) çocuklarda mutasyona uğramaktadır (Waye vd., 2018).

Bazı vakalarda, otistik özellikler tek gen bozukluğunun (Rett sendromu, Fragil X sendromu, Angelman sendromu gibi) fenotipik ekspresyonunun bir parçası iken, diğerlerinde ise; popülasyonda görülen yaygın genetik varyasyonların kombinasyonları ile genetik olmayan faktörler geniş bir otizm fenotipine katkıda bulunarak adeta tamamlayıcı/tetikleyici rol üstlenmektedirler. Otizmli vakaların % 10'u bir genetik sendromun bir parçasıdır ki bu durumda malformasyonlar ve/veya dismorfik özellikler eşlik etmektedir ve bunlara "sendromik otizm" denilmektedir ve bütün vakalarda erkek/kadın görülme oranı birbirine eşittir. (Eapen, 2011; Ghahramani Seno vd., 2011; Goldani vd., 2011, O'roak ve State, 2008; Persico ve Napolioni, 2013; Talkowski vd., 2013; Sener vd., 2016).

Aday genler sekanslama çalışmaları ile *NRXN1*, *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK2*, *SHANK3*, ve *CNTNAP2* genlerini içine alan bazı genler otizme duyarlılık genleri olarak tanımlanmışlardır (Cho vd., 2009; Ghahramani Seno vd., 2011; Goldani vd., 2011, Sener vd., 2016).

Feliciano vd, (2019) 457 otizmli ailelerde, otizm ile ilişkili olabilecek risk genlerini ekzom sekanslama ve geniş genom tek nükleotid polimorfizm (SNP, single nucleotide polymorphism) genotipleme ölçümü ile daha önceden genetik bulguları olmayan OSB'li çocukları olan ailelerde %10.4 oranında, çalışılan genlerde ve lokuslarında varyantlara rastlanmıştır. Bu sonucun OSB tanımlı çocuğu olan ailelerin %14'ünde genetik bir neden olabildiğini de ortaya koymuşlardır. Çalışılan genler içinde altı çeşit gen özellikle otizm ile genetik ilişki açısından anlamlı ve güçlü ilişkili olarak bulunmuştur; *BRSK2*, *FEZF2*, *ITSN1*, *PAX5*, *DMWD*, ve *CPZ*. Bu altı genlerden ise *BRSK2* geni otizm ile en güçlü ilişkili olarak bulunmuştur.

Persico ve Napolioni, (2013), tarafından hazırlanan otizm genetiği adlı kapsamlı derlem yazısında, otizm genetiği ve otizm ile ilişkili olabilecek genler çok güzel

sınıflandırılarak sistematik olarak ele alınmıştır. Konu başlıca iki ana kısma ayrılmıştır; 1. Monogenik otizm 2. Non Sendromik otizm.

Monogenik otizm yedi alt gruba ayrılmıştır;

1. Otizmin eşlik ettiği ana genetik sendromlar: Frajil X Sendromu (FXS), ve Tuberosklerozis (TS).
Sinaptik protein sentezi regülasyon genleri: *FMR1*, *TSC1/2*, *EIF4E*, ve *PTEN*
Otizm ile sıkı ilişkilidirler.
2. Kopya sayı varyantları (CNVs)
3. Sinaptik genler: Nöroliginler, *SHANK (1,2,3)* ve Nöroksinler.
Nöronal sinaps formasyonu, maturasyonu ve stabilizasyonu ile ilişkili kiritik öneme sahip preteinleri kodlayan genler. *SHANK1,2,3*: Nöronal sinapsların mükemmel yapısı ve fonksiyonu için sinaptik iskele yapısını oluşturan proteinleri kodlar
4. Kromatin mimar genleri: *MECP2*.
Doğru Beyin fonksiyonu ve gelişimi için gereklidir. *MECP2* geni fonksiyon kaybı, nöronal maturasyonda ve sinaptogenezde gecikme ile sonuçlanır.
5. Morfogenetik ve büyümeyi regüle eden genler: *HOXA1*, *PTEN*, *EIF4E*.
Fasial dismorfizm, malformasyonlar, mikrosefali, makrosefali, mikrozomi veya makrozomi ile ilişkilidirler.
6. Kalsiyum ile ilişkili genler: *CACNA1C*, *CACNA1F*, *KCNMA1*, ve *SCN2A*. Fonksiyon artırıcı mutasyonlar; voltaj bağımlı kanal inaktivasyonunu önleyerek aşırı miktarda kalsiyum girişine neden olmaktadır.
7. Mitekondriyal formlar.
Mitekondriyal DNA (mtDNA) veya nükleer DNA (nDNA) da meydana gelen mutasyonlar, ağır mitekondriyal fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır.

Bugüne kadar otizm ile ilişkili olan genler ve bu genlerin davranışlar üzerine etkileri üzerine çok farklı ülkelerde ve merkezlerde çok sayıda çalışmalar yürütülerek tamamlanmış ve bildirilmiştir. Bu çalışmalarda belirlenen genler ve davranışlar üzerine etkileri Çizelge 1.1 de verilmiştir (Auerbach vd., 2011; Blundell vd., 2010; Chao vd., 2010; Cheh vd., 2006; Chubykin vd., 2007; Duffney vd., 2015; Gao ve

Penzes, 2015; Ghahramani Seno vd., 2011; Gogolla vd., 2009; Haws vd., 2014; Hung vd., 2008; He ve Portera-Cailliau, 2013; Jamain vd., 2003; Kim vd., 2017; Kwon vd.; 2006; Lee vd., 2017; Lin vd., 2013; Lugo vd., 2014; Ma vd., 2018; Molosh vd., 2014; Patel vd., 2018; Peca vd., 2011; Pop vd., 2014; Provenzano vd., 2012; Tabuchi, vd.,; Yi vd., 2016).



Çizelge 1.1: Otizm ile ilişkili genler ve sorumlu oldukları davranışlar

Gen	Gen Adı	Davranış Fenotipi
<i>ATG7</i>	Otofaji ilişkili 7	↓ S
<i>SHANK1</i>	SH3 ve Çoklu ankirin tekrar domeinleri	↑SM, ↓FC,M, uzun dönemSM
<i>SHANK3</i>	SH3 ve Çoklu ankirin tekrar domeinleri	↑anksiyete, kısa dönemSM,↓OSB kor LM
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve tensin homoloğu	↓S, duyuusal uyarıya cevap
<i>TSC1</i>	Tuberosklerozis1	↓S, LM, FC
<i>TSC2</i>	Tuberosklerozis2	↓iletişim, LM, FC
<i>FMR1</i>	Fragil X	mental retardasyon↓S, iletişim, algı, dikkat eks, nöbetler
<i>DPP6</i>	Dipeptidil peptidaz6	↓LM
<i>NLGN1</i>	Nöroligin1	↓S, LM, ↑steriotipik davranış
<i>NLGN2</i>	Nöroligin2	↓S, ↓steriotipik davranış
<i>NLGN3</i>	Nöroligin3	↓S
<i>NLGN4</i>	Nöroligin4	↓S
<i>MECP2</i>	Metil-CpG-bağlayan protein2	↓steriotipik davranış, nöbetler
<i>NF1</i>	Nörofibromin1	↓S, SM
<i>EN2</i>	Engrailed homebox2	↓S, LM, nöbetler
<i>RELN</i>	Reelin	↓OSB kor, motor nöbetler
<i>CNTNAP2</i>	Contactin-ilişkili protein benzeri-2	↓OSB kor, Hiperaktiv, nöbetler
<i>UBE3A</i>	Ubiquitin protein ligaz E3A	↓OSB kor, LM, motor, algı, nöbetler
<i>SYNGAP1</i>	Sinaptik Ras GTPaz aktive eden protein Ia	↓LM, entellekt yet.
<i>CNTN4</i>	Kontaktin4	↓algı, duyuusal cevap
<i>NRXN1</i>	Nöroeksin1	↑steriotipik davranış, motor
<i>GABRB3</i>	Gama aminobutirik asit tipA reseptör beta3 subunit	↓OSB kor, LM, motor, algı
<i>CACNA1C</i>	Kalsiyum voltaj kanalı subunit alfa1C	hiperakt., nöbetler, ↓S, LM, entellekt yet.

S; sosyallik, SM; Mekansal Hafıza, M; Motor fonksiyon, FC; korku durumu, OSB kor: Sosyal ve iletişim problemleri ve ardışık/steriotipik davranışlar, LM; Öğrenme & hafıza.

1.10. Otizm Ve CC2D1A Geni

CC2D1A Gen ekspresyonu, varyasyonları ve OSB ile ilgili sınırlı sayıda literatüre ulaşılmış olup, bu çalışmaların tamamı dikkatlice incelenmiştir. *CC2D1A* genii OSB (ASD) ile birlikte mental retardasyon (MR), entellektüel yetersizlik (EY/Intellectual Disability, ID) ile de ilişkilendirilmiştir ki; entellektüel yetersizlik OSB'ye de eşlik edebilmektedir (Zamarbide vd., 2018).

CC2D1A geni 19p13.12 üzerinde lokalize 20 ekzon içeren geniş 24,640 bazpair içerir ve ilk önce mental retardasyon ile ilişkilendirilmiştir (Basel-Vanagaite vd., 2007; Shi vd., 2012). Bu gen 951 aminoasitli bir protein kodlar (Basel-Vanagaite vd., 2006). *CC2D1A* NF-kB promotör orijinal aktivatörü olarak tanımlanmıştır ki, NF-Kb'nin hafıza ve nöral plastisite konusunda çok önemli olduğu bilinmektedir (Basel-Vanagaite vd., 2007; Matsuda vd., 2003, Sener vd., 2016).

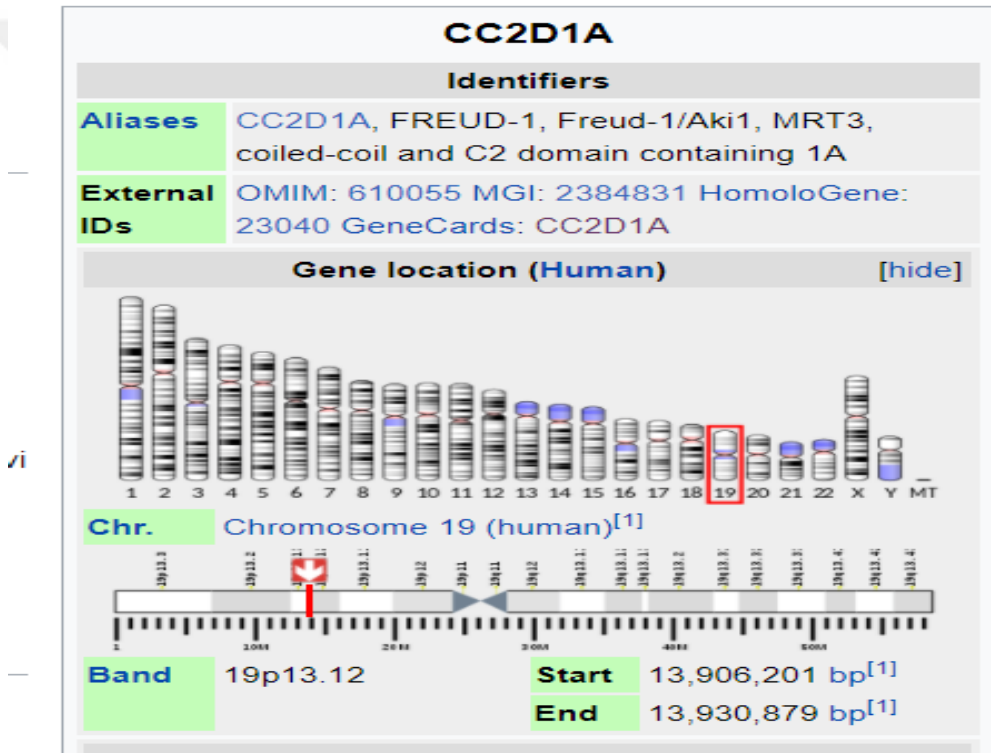
Şimdiki bilgilerimiz *CC2D1A* fonksiyonunun fazlalığı veya eksikliği her ikisinin de, NF-kB aktivasyonunun artırdığını doğrulamaktadır (Manzini vd., 2014). Bununla birlikte *CC2D1A*'nın fizyolojik fonksiyonu hala büyük oranda bilinmemektedir (Zhao vd., 2011). Daha sonraları, transfeksiyon çalışmalarında *CC2D1A*'nın serotonin -1 A reseptörünün (5-HT1A) 5' represor elementine bağlanarak, reseptörün ekspresyonunun tekrar baskılanmasını sağladığı gösterilmiştir (Rogaeva vd., 2007, Sener vd., 2016). *HTR1A* reseptörü serotonerjik nöronların soma ve dendritlerinde yerleşmiş olan bir otoreseptördür. Bu nedenle *HTR1A* otoreseptör fonksiyonunda azalma serotonin transmisyonunda azalmaya neden olmaktadır, bu durumda ise, *HTR1A* nın aracılık ettiği hedef nöronların fonksiyonunda azalmanın sonucunda nöronal transmisyonun etkisinde azlama ile sonuçlanmaktadır (Albert vd., 2011, Sener vd., 2016).

CC2D1A geni, çift kıvrımlı ve C2 domain içeren protein 1A geni olup; bir serotonin reseptör 1A (*HTR1A*) ekspresyon baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Basel-Vanagaite vd., 2016, Sener vd., 2006).

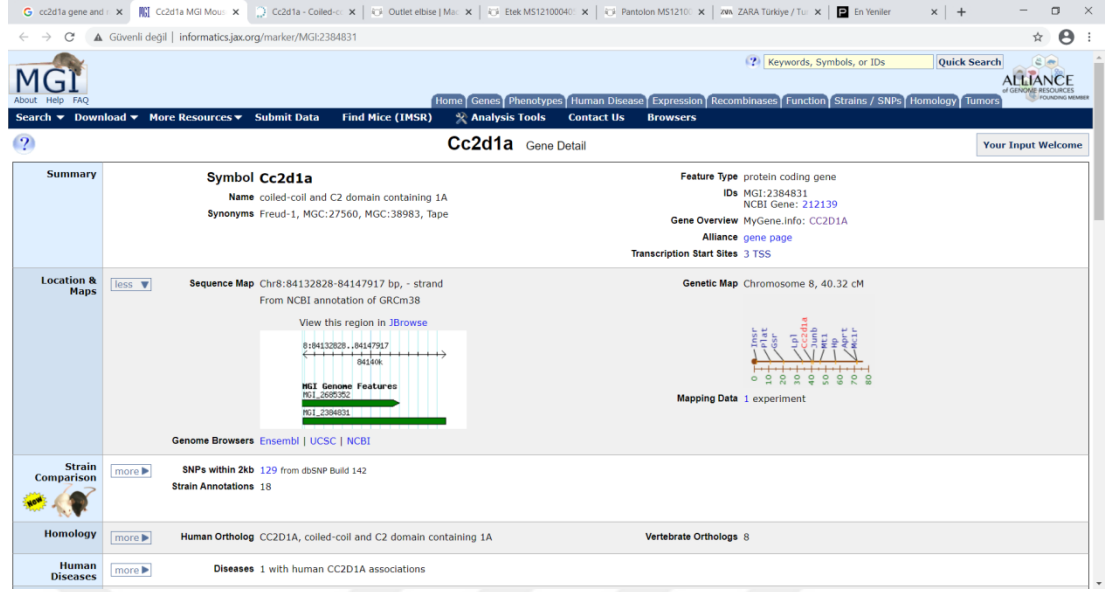
CC2D1A'nın eksikliği 5-HT1A reseptörü'nün daha yüksek seviyelerde ekspresyonuna yol açarak, adenilat siklazı inaktive ederek, cAMP yolağının

inaktivasyonuna neden olabilir (Basel- Vanagiate vd., 2007; Rogaeva vd., 2007, Sener vd., 2016).

Serotonin sinaptogenez ve nöronal migrasyonda önemli roller oynayan bir nörotransmitterdir (David vd., 2005; Oblak vd.,2013). Serotonin sistemindeki anormalliklerin otizmi de içine alan birtakım psikiyatrik bozuklukları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Albert vd., 2011; Gabriele vd., 2014; Selvaraj vd., 2014, Sener vd., 2016). Hiperserotoninemi (serotonin seviyesinin kandaki miktarının artması) otistik hastaların yaklaşık 1/3'ünde görülmektedir (Coutinho vd., 2007; Kesper ve Homberg, 2015).



Şekil 1.5: İnsanlarda *CC2D1A* Geni Lokalizasyonu (İnt. Kyn.2).



Şekil 1.6: Sıçanlarda *CC2D1A* Geni Pozisyonu (İnt. Kyn.4).

1.11. Deneysel Hayvan Modelleri Ve Otizm

Deney hayvanları otizm modelleme çalışmaları ile ilgili çalışmalarını içeren literatürleri incelediğimiz zaman çalışmaların kemirgenler (rodent) (fare/mice/murine, sıçan/rat) ile yapılmış olduklarını görmekteyiz (MacFabe v.d., 2007; Watts, 2007).

Deney hayvanları ile yapılan otizm modelleme çalışmalarını incelendiği zaman; otizm için aşağıdaki modelleme yöntemlerinin başlıca olarak kullanıldığını görmekteyiz;

1. İntra serebro ventriküler olarak (ICV) sıçanların sağ ventrikülüne propiyonik asitin, (PPA) tek doz (0.26 M de 4µl) olarak verilmesi. Bu uygulamadan 24 saat sonra sıçanlarda otistik bozuklukların meydana gelmeye başladığı bildirilmiştir (MacFabe v.d., 2007; MacFabe v.d., 2011).
2. Dişi gebe sıçanlara gebeliğin 12.5.gününde valproik asitin intraperitoneal olarak tek doz (600 mg/kg) olarak verilmesi ile doğan bebek sıçanların otizmde görülen davranış bozukluklarını sergilediği gösterilmiştir. Bu çalışmamızda bu modeli uygulanmıştır (Al-Askar M v.d., 2017).

3. Belirli kirterlere (otizm dışında herhangi bir nöropsikiyatrik tanış ve bozukluğu olmayan, mikrobiyota ile ilişkili olabilecek herhangi bir metabolik hastalık tanış ve bozukluğu olmayan, son bir ay içinde bağırsak mikrobiyotasına wetki eden herhangi bir ilaç ve gıda takviyesi (probiyotiki antibiyotiki, anitfingal, anti paraziter, antiviral ajanlar) kullanmamış ve aktif gastorenterit tablosu bulunmayan, KOVİD testi negatif olan ve otizm tanılı çocuklardan elde edilen gaita örneklerinin fekal mikrobiyota transferi için ön hazırlık işlemleri uygulandıktan sonra gaitadan elde edilen bağırsak mikrobiyotası içeren süspansiyonun belirli hacimde (150µl) oral gavaj ile tek doz transferini takiben 21 gün beklemeye alınmasından sonra gebe kalan dişi farelerden doğan bebek farelerin otizm de görülen davranış bozukluklarını sergilediği bildirilmiştir (Sharon v.d., 2019).

Yukarıdaki modelleme için bağırsak mikrobiyotası ve vücutta mikroroganizma içerip içermemesi açısından en ideal denek grubu steri fare olarak bilinen vücutunda hiçbir bölgede mikroroganizma içermeyen, mikroganizmalardan arınmış farelerdir (germ free mice). Ancak bu grup deney hayvanları ile böyle bir çalışma yapabilmek için deney hayvanı laboratuvarının biyogüvenlik düzeyinin BGD-3 (BSL-3; Biosafety Level) olması gerekmektedir ki bu gün tarii itibarı ile maalesef Ülkemizde BGD-3 Deney Hayvanları Laboratuvarı bulunmamaktadır.

Bağırsak mikrobiyotası ve vücutta mikroroganizm içerip içermemesi açısından deney hayvanları başlıca üç gruba ayrılabilir (steril fareler; germ free mice, GF mice, belirli mikroorganizmalardan arınmış ve arındırılmış olduğu testler ile belgelenmiş olan fareler; spesifik apthogen free mice, SPF mice, vücutunda ve bağırsaklarına normal mikrobiyota içeren fareler).

Belirli mikroorganizmalardan arınmış ve arındırılmış olduğu testler ile belegenmiş olan fareler; (spesifik apthogen free mice, SPF mice) ile yapılacak deney hayvanı modellem çalışmaları için biyogüvenlik düzeyi BGD2 (BSL2) deney hayvanı laboratuvarları gerekmektedir ki; Ülkemizde bu seviy şartlarına sahip olan 3-5 laboratuvar bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli virüslere ait antikorlardan arınmış deney hayvanlarının temini de mümkündür (Virus Antibody Free, VAF). Bu özel deney hayvanlarının

üretimi ve temini için iki laboratuvar (The Jackson Laboratories, JAX, Bar Harbor, ME, USA, Charles River Laboratories, MA, Wilmington, USA) özelleşmiştir ve profesyonel hizmet sunmaktadır. Bu özel grup deney hayvanları bağışıklıkları açısından iki grup halinde (immünitesi normali immucompetent, immünetesi baskılanmış, immuncomprimised) temin edilebilmektedir.

Oitizm odellemelri için *Mus musculus* cinsinde yer alan iki fare tipinden (*BALB/c*, *Swiss albino*) *Swiss albino* cinsi daha öök tercih edilmektedir.

4. Transgenik (knockout) fareler. Bu grup ise belirli hastalıklarda (Otizm, Alzheimer Hastalığı...vs) ileri araştırmalar yapmak üzere önceden modellenmiş farelerdir ki Ülkemizde Yeditepe Üniversitesi Nörofizyoloji AD, bu fare grupları farklı hastalıklar için üretilmeye başlanmıştır.

Çalışmamızda; üçü (fingolimod, kurkumin, ve N- asetil sistein) modern tıpta, ikisi (kurkumin ve resveratrol) alternatif ve tamamlayıcı tıpta kullanılan toplam beş adet etken maddelerin, otizmde görülen davranış bozuklukları üzerine iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan beş ayrı eken maddelerin etkş mekanizmaları ve otizm ile muhtemel olumlu ilişkilerihakkında tartışmanın giriş kısmında ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

1.12. Geleneksel Ve Tamamlayıcı Tıp Ve Otizm

Çalışmamızda Geşenkesel ve Tamamlayıcı Tıp (GETAT, COM, Complementary and Alternative Medicine) kapsamında, iki etken madde (kurkumin ve resveratrol) denenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi (NCCAM; The National Center for Complementary and Alternative Medicine) tarafından GETAT/COM şu şekilde tanılanmıştır; ‘genellikle kanvansiyonel tıbbın bir parçası olmayan bir grup farklı tıbbi ve sağlık bakım sistemleri, uygulamaları, ve ürünleridir’ (Akins vd., 2010; İnt. Kyn.1)

Otizimli çocuklarda GETAT/COM kullanım prevelansı, toplumun genelindeki kullanım sıklığına göre en yüksek orandadır; %52-95 ve sosyo-ekonomik seviyesi yüksek ve anne babadan en az birisinin üniversite lisans mezunu ailelerde daha yüksek kullanım oranları bildirilmiştir (Akins vd., 2010; Hanson vd., 2007; Wong ve

Smith, 2006). Otizmli çocuğu olan ailelerin birçok GETAT/COM tedavi yöntemlerini tercih ettikleri ve %50-70'nin ise biyolojik tabanlı GETAT/COM yientemini tercih ettikleri bildirilmiştir (Akins vd., 2010; Harrington vd., 2006; Levy ve Hyman, 2003; Nickel ve Gerlach, 2001).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi sınıflandırma sistemine göre alternatif ve tamamlayıcı tıp uygulamaları başlıca beş ana gruba ayrılmıştır;

1. Düşünce-Beyin Tedavileri: Meditasyon, dua, mental iyileşme
2. Biyoloji Temelli Pratikler: Bitkiler, vitaminler ve diyet ilave maddeleri
3. Manuplasyon Uygulamaları ve Vücut Bazlı Uygulamalar
4. Enreji Tıbbı: Çigong, reiki, tedavi edici dokunuşlar)
5. Bütün Medikal Sistemler: İlk dör maddede zikredilen sistemlerin kombinasyonu şeklinde uygulamalardır.

Otizm tedavisinde bugüne kadar faz III çalışmaları tamamlanarak insanlarda kullanım için onay ve ruhsat almış bir ilaç bulunmamaktadır. Otizmin tedavisine bakış açısı noktasında Dünyadaki eğilimler ile Ülkemizdeki eğilimler birbirleri ile benzerlik gösteren noktalar içermekle birlikte; kapsam ve içerik açısından farklılık bulunmaktadır. Kısaca başta ABD olmak üzere dünya genelinde birçok ülkede otizm tdaavisine medikal tedavi + özel eğitim konsepti ile yaklaşım benimsenmiş ve kurumsal olarak da bu anlayış desteklenerek somut uygulamaların yürütüldüğü merkezler kurulmuştur. Ülkemizde ise otizm tedavisinde tek yön olarak özel eğitim şeklinde yaklaşılmakta ve medikal yaklaşım maalesef red edilmekte, ve hatta hastalığın medikal yönü olmadığı konusunda bilimsel literatür desteği olmayan, önyargılara dayalı bir nalayış olduğu izlenmektedir. Halbuki multisistemik etiyoloji ile ilişkili olduğu yürütölmüş ve yayımlanmış olan birçok çalışmalar ile (deneysel hayvan modelleme çalışmaları, insan progenitörnörönel hücreler dahil hücre kültür çalışmaları, post mortem insan beyin dokusu otopsi çalışmaları, ve otistik çocuklar ile sağlıklı kontrol grubu çocuklar, ve bazılarında anneleri ile birlikte yapılmış olan çalışmalar) ispatlanan bir hastalığa bakış ve yaklaşım konusunda multidisipliner ve multisistemikbir konsept ve bütöncöl yaklaşım anlayışının ortaya konulması ve benimsenmesi kuşkusuz hastalığın etiyo-petogenez seyrine ve tıbbi tabiatına daha

uygundur (Abdelli vd., 2019; Di Stasi vd., 2019; Garbett vd., 2008; Huuskonen VD., 2004; Li vd., 2019; MacFabe vd., 2007; MacFabe vd., 2011; Matta vd., 2019; Meeking vd., 2020; Ruhela vd., 2019; Sharon vd., 2016; Sharon vd., 2019; Schleider vd., 2019; Shultz vd., 2008; Shultz vd., 2009; Wu vd., 2020; Yang vd., 2020).

Çalışmamızda otizmde görülen bozuklukların iyileştirilmesi ve azaltılması amacı ile beş farklı maddeler denenmiş ve etkinlikleri birbirleri ile ve tedavi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır; fíngolimod, kurkumin, resveratrol, süramin ve N-asetil sistein. Çalışma kapsamına alınan iyileştiric etkileri olup olmadığı araştırılan beş maddelerden üçü (fíngolimod, suramin, ve N asetil sistein) modern tıp alanında, ikisi (kurkumin toz; zerdeçal ve resveratrol toz; siyah üzüm çekirdeği ekstraktı) ise geleneksel ve tamamlayıcı tıp (GETAT)/ tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM, complementary and alternative medicine) kapsamında uygulamalarda kullanılan etken maddelerden oluşmaktadır. Bu maddelerin seçimlerinde hem daha önce yapılmış olan çalışmalar incelenmiş, hem de çalışma kapsamına alınan maddelerin etki mekanizmaları ile otizm seyrinde meydana gelen ve görülebilecek olan patolojik değişiklikler ve bozukluklar dikkate alınmıştır.

Çalışmamızda otizm modellemesinde kullanılan Valproik asit (VPA) basit ve kompleks epilepsilerin tedavisinde kullanılan antiepileptik bir ilaçtır. Epilepsili gebe kadınlarda VPA kullanımı fetüste başlıca; spina bifida, yarı damak, dudak bozukluklarına ve kardiyak malformasyonlara neden olabilen bir riske sebebiyet verebilir (Browne vd., 1980; Kini vd., 2006; Sunand vd., 2020). VPA güçlü bir teratojen maddedir ki, prenatal veya postnatal dönemde VPA'ya maruz kalmak; oksidatif stres faktörlerinin tetiklenerek aktive olmasına ve bunun sonucunda da sinirlerin büyüme ve gelişimlerinin bozulmasına neden olabilir (Ming vd., 2008; Sunand vd., 2020).

Çalışmamızda kullanılan fíngolimod (FTY720); sfíngozin 1 fosfat (S1P) analogu, immünmodülatör etkili, S1P1 reseptörlerinin (S1P1R) modülasyonu ile lenfopeniyi indükleyerek immün sistemi baskılayıcı etkisi olan, oral bir ajandır (Cipriani vd., 2015; Gao vd., 2012; Sharma vd., 2011; Wu vd., 2017). Fíngolimod 2010 yılı Eylül ayında multiple sklerozis (MS) tedavisinde kullanımı için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA, Food and Drug Administration) tarafından onay almıştır (Cipriani

vd., 2015; Gao vd.,2012; Sharma vd., 2011; Wu vd.,2017; FDA approves the first oral drug for reducing multiple sclerosis relapses).FTY720'nin antioksidan, antiapoptotik, ve anti-inflamatuvar etkileri nedeni ile koruyucu veya onarıcı etkileri olduğu, nöronlarda da koruyucu etki gösterdiği, Huntington hastalığı, inme, ve Alzheimer hastalığı (AD, Alzheimer disease)gibi nörolojik birkaç hastalıklarda kognitif fonksiyonları artırdığı bildirilmiştir (Brunkhorst vd., 2013; Cipriani vd., 2015; Ghasemi vd., 2016;Nazari vd., 2016; Wu vd., 2017; Zhang vd., 2016).

Çalışmamızda kullanılan suramin; pürinerjik sinyal inhibitörü olan antipürinerjik etkili (APDs; antipurinergic drugs) ve çok iyi bilinen ve yıllardır Afrika Uyku Hastalığı (tripanozomiazis) tedavisinde kullanılan ve halen de bu hastalığın tedavisinde kullanılması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, WHO, World Health Organisation) tarafından tavsiye edilen bir ilaçtır (Burnstock, 2006; Naviaux, vd., 2017). Düşük doz suramin uygulamasının maternal immün aktivasyon ve Fragil X fare modeli otizm üzerine etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014; Naviaux vd., 2015, Naviaux vd., 2017).

Çalışmamamızda kullanılan N- Asetil sistein (NAC); antioksidan olarak uzun yıllar bilinen ve yaygın olarak kullanılmış olan bir ilaçtır ve yapılmış çeşitli çalışmalar otizmli hastaların özellikle steriotipik ardışı tekrar hareketlerinin alternatif tedavi stratejisinde bir potansiyle sahip olabileceği önerilmiştir (Al-Dbass, 2014, Farr vd., 2003; Zhang vd., 2017).

Çalışmamamızda kullandığımız kurkumin (*Curucuma longa*); Asya zerdeçal köklerinden ekstrakte edilen, “altın baharat” veya “hayatın baharatı” olarak da nitelendirilen, toksik olmayan yüksek dozlarda kan beyin bariyerini (BBB) geçebilen, oral yoldan verildiğinde biyoyararlanımı düşük olduğu için oral yoldan kullanıldığında kan seviyeleri çok düşük olan doğal fenolik bir üründür.(Al-Askar vd., 2017; Bhandari ve Kuhad, 2015; Di Meo vd., 2019, Gan vd., 2019).

Çalışmamızda kullandığımız resveratrol (RSV)bir polifenolik stilbenoiddir ve antioksidan, antienflamatuvar ve dolayısı ile de nöronkoruyucu etkileri olduğu bilinmekle birlikte; son yıllarda birçok deney hayvanı modellemelerinde bazı nörolojik hastalıkların ve aptogenezinde immün modülasyon bozuklukları ve

oksidatif stress ve enflamasyon yollarının (nöroenflamasyonun) aktive olduğu bilinen OSB gibi nörogelişimsel bozuklukların iyileştirilmesinde denenmiştir (Arafat ve Shaban, 2019; Malaguenera vd., 2020).

Bu çalışmada otizmde beyinde meydana gelen patolojik değışikliklerin gösterilmesi ve otizmde görülen bilişsel becerilerdeki bozuklukların hafifletilmesi açısından beş etken maddelerin etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ilaveten CC2D1A gen ekspresyon seviyeleri ile otizmde görülen bozukluklar arasındaki korelasyonun, ve iyileştirici olup olmadıkları araştırılan beş etken maddelerin CC2D1A gen ekspresyon seviyesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Etik Kurul Onayı

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKUHADYEK) AKUHADYEK-195-13 nolu etik kurul raporu alınarak uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

2.2. Deneysel Otizm Modellemesi Ve Uygulanması

Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde yürütülerek tamamlanmıştır.

Wistar albino cinsi 30 adet dişi ratlar, 6 adet erkek ratlar ile konsepsiyon sonucu gebe kalmaları sağlanmıştır. Gebelik oluştuktan sonra ratlar başlıca iki gruba ayrılmıştır. 1. Grup Kontrol grubu, 5 rat. Geri kalan 25 adet ratların tamamı ise çalışma grubunu oluşturmuştur. Kontrol grubu ratlara hiçbir işlem yapılmayarak doğumları sağlanmış ve bebek ratlardan 8 tanesi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Grupların ayrıntıları aşağıda 2.3. Deney Hayvanları ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması başlığı altına açıklanmıştır. Çalışma grubu 25 adet ratların gebelikleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı tarafından vaginal sekresyonları takip edilerek gebeliğin 12.5. günü belirlenmiştir. Bu günde dişi gebe ratlardan çalışma grubuna ayrılan ratların tamamı intra peritoneal olarak 600 mg/kg dozunda valproik asit tek doz olarak uygulanmıştır. Doğumu takiben 48 adet bebek ratlar ile çalışma grubu oluşturulmuştur. 1. Grup Hastalık kontrol grubu, 8 adet bebek rat. İkinci grup tedavi grubu 40 adet bebek rat. Tedavi grubu ise herbiri 8 adet olan beş alt gruba ayrılarak (toplam 40 bebek fare) beş farklı maddenin otizmde görülen davranış bozuklukları için iyileştirici özlikte olup olmadıkları incelenmiştir. Tedavi amacı ile üçü (N Asetil sistein, suramin, ve fingolimod) modern tıpta kullanılan ikisi (resveratrol ve kurkumin) ise alternatif ve tamamlayıcı tıpta kullanılan beş farklı etken madde test edilmiştir.

Otizm modellemesi valproik asit ile uygulanmıştır. Gebeliği 12.5 gününde dişi gebe ratlara tek doz (600mg/kg) valproik asitin intra peritoneal olarak verilmesi ile bebek farelerin otizimli doğmaları sağlanmıştır.

2.3. Deney Hayvanları Ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 30 adet dişi, 6 adet erkek *Wistar albino* cinsi rat kullanılmıştır. Dişi bütün ratların erkek ratlar ile konsepsiyonu sonucunda tamamının gebe kalması sağlanmıştır.

Denek Gruplarının Oluşturulması

Çalışma Grubu

Yirmi beş adet gebe dişi rat, gebeliğin 12.5 gününde intraperitoneal olarak tek doz 600 mg/kg Valproik asit (VPA) uygulaması ile deneysel otizm modeli oluşturulmuştur.

Sağlıklı Kontrol Grubu

Beş adet gebe dişi rata hiçbir madde verilmemiştir.

Hiçbir madde verilmeyen 5 adet gebe ratlardan doğan 8 adet yavru ratlar ile Sağlıklı Kontrol Grubu oluşturulmuştur.

Sağlıklı kontrol grubu bebek ratlar 7. Gününden başlayarak üçer kez Morris Water Maze testi uygulanmış ve base line skorlar (sağlıklı ölçümler) kaydedilmiştir.

Hastalık Grubu

İntraperitoneal Valproik asit verilen 25 adet dişi gebe ratlardan doğan 48 adet bebek ratlar ile hastalık grubu oluşturulmuştur.

Yenidoğan ratlar 7 günlük olunca bir hafta (7 gün süre ile) 7.- 14. Günler arasında Morris Water Maze testi uygulanarak skorlar elde edilmiş ve kaydedilmiştir böylece otizm gelişip gelişmediği belirlenmiştir.

Otizm modeli oluşmayan bebek sıçanlar çalışma kapsamı dışında tutulacaktır.

Otizm kararı verilirken sağlıklı kontrol grubuna ait base line davranış testlerine ait ölçüm değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Otizm modeli gelişen ratlar 14. Günde (200-250 gram ağırlığına ulaştıklarında)

Hastalık grubunu oluşturan 48 adet bebek sıçanlar, herbiri 8'er adet olmak üzere 6 alt gruba ayrılmıştı

r, bunlardan herbiri tedavi grubunu, altıncısı ise tedavi kontrol grubunu oluşturmuştur.

Tedavi Grubu 1 Tedavi grubu 1'i oluşturan 8 adet bebek sıçanlara tedavi denemesi amaçlı suramin verilmiştir.

Intra peritoneal yol ile 20 mg/kg Suramin (Suramin Sodium Salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), steril distile su içinde çözülmüştür, günde bir doz 4 hafta süresince verilmiştir.

Tedavi Grubu 2 Tedavi grubu 2'yi oluşturan 8 adet bebek sıçanlara tedavi denemesi amaçlı olarak N-Asetil sistein (NAC) (N-Acetyl-L-cysteine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) steril distile su içinde çözülmüştür, ve verilmesi sağlanmıştır.

150 mg/kg, intraperitoneal yol ile, günde bir doz NAC, 4 hafta boyunca verilmiştir.

Tedavi Grubu 3 Tedavi grubu 3'ü oluşturan 8 adet bebek sıçanlara tedavi denemesi amaçlı fingolimod (FTY720, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) steril distile su içinde çözülmüştür ve verilmesi sağlanmıştır.

1 mg/kg dozunda, günde tek doz olmak üzere 4 hafta süresince oral yoldan fingolimod (FTY720) verilmiştir.

Tedavi Grubu 4 Tedavi grubu 4'ü oluşturan 8 adet bebek sıçanlara tedavi denemesi amaçlı resveratrol steril distile su içinde çözülmüştür ve 1 g/kg dozunda olacak şekilde, 1 ml oral yoldan, günde bir doz resveratrol (Resveratrol, Chem Cruz, Sant Cruz Bitotechnology, Inc, Dallas, TX, USA), 4 hafta boyunca verilmiştir.

Tedavi Grubu 5 Tedavi grubu 5'i oluşturan 8 adet bebek sıçanlara tedavi denemesi amaçlı kurkumin verilmiştir.

1 g/kg dozunda olacak şekilde, 1 ml, oral yoldan, günde bir doz kurkumin (Curcumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany, 0.5M sodyum hidroksit (NaOH) içinde çözülmüştür, ve 4 hafta boyunca verilmiştir.

Hastalık (Tedavi) Kontrol Grubu Hastalık grubu içindeki 6. Alt grupta yer alan 8 adet bebek sıçanlara tedavi edici hiçbir madde verilmemiştir ve böylece hastalık (tedavi) kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu gruba tedavi denemesi yapılmaksızın % 0.9 Saline verilmiştir.

(%0.9 Saline, 5 µl/g) tedavi denemesi yapılmayan hastalık (tedavi) kontrol grubu oluşturulmuştur.

Davranış testleri tamamlandıktan 21 gün sonra ratların tamamı sakrifiye edilerek beyin dokusu örnekleri (hippocampus) elde edilmiştir. Hippocampus dokusundan kesitler alınarak preparatlar hazırlanacak ve immün histokimya metodu ile histolojik ve patolojik incelemeler yapılacaktır. Hematoxilen Eosin (H&E) boyama uygulanmıştır.

Beyin dokusundan RNA ekstraksiyonu takiben, real time PCR (rt-PCR) metodu ile CC2D1A ve CASP3 genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Beyin dokusu ön işlemler ile ELISA testlerinin çalışılabilmesi için homojenizasyon işlemi uygulanarak hazır hale getirilmeleri sağlanmıştır.

Homojenizasyon sonrasında ise aşağıdaki testler ELISA yöntemi ile beyin dokularından çalışılmıştır.

1. İnterlökin 1 beta-IL1 β
2. İnterlökin 6-IL6
3. Tümör nekrozis faktör alfa-TNF α
4. Glutasyon peroksidaz-GPX
5. Malondialdohit-MDA
6. Kaspaz3-CASP3

Tedavi denemesi uygulanan beş gruplariyle, tedavi denemesi uygulanmayan kontrol grubuna ait beyin kesitlerine ait histopatolojik bulgular birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Otizmin ile meydana gelen beyindeki hasar, değişimler ve tedavi denemesi sonrası beyin dokusunda nasıl bir etkinin olduğu incelenmiştir.

2.4. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi Ve Beyin Dokusu Örneklerinin Alınması

Ratların canlı ağırlıkları belirlendikten sonra ağrı ve acı çekmemeleri için intraperitoneal olarak 10 mg/kg rompun (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve 70 mg/kg ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma Ag, Avusturya) ile anestezi uygulanarak ötenazi uygulanmıştır. Servikal dislokasyon gerçekleştirildikten sonra usulüne uygun olarak kalvaryum uzaklaştırılarak beyin dokusu elde edilmiştir. Elde edilen Beyin, dokusu öncelikle makroskobik olarak muayene edilmiştir. Daha sonra ise beyin dokusu sagittal kesit ile ikiye bölünmüştür. Beynin kısımları olan sağ hemisfer, beyincik ve beyin kökü elde edilmiştir. Elde edilen beyin dokusunun bir hemisferi histopatolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alınmıştır. Diğer hemisfere ait olan beyin dokusu ise ELISA ölçümleri ve gen ekspresyon analizi için -80°C de derin dondurucuda analiz zamanına kadar saklanmıştır.

2.4.1. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik incelemeler için beyinden alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilmiştir. Formalin tespitindeki doku örnekleri 2-3 mm kalınlıkta ve uygun büyüklüklerde küçültülerek doku takip kasetlerine alınmıştır. Çeşme suyunda bir gece yıkandıktan sonra 50, 70, 80, 96'lık ve absölüt alkol ile ksilol, ksilollü parafin ve 56-58 °C'de erimiş parafinde 2'şer saat tutulmuş ve sonra da parafinde bloklanmıştır. Her parafin bloktan mikrotom (Leica, RM 2245) ile 5 mikron kalınlığında kesilen örnekler su banyosu (Leica, HI 1210) aracılığıyla lamlara alınmıştır. On dakika etüvde kurutularak (Thermo, Heratherm) histopatolojik yöntemlerde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir. Tüm kesitler absölüt, 96, 80, 70 ve 50'lık alkol serileri ile ksilol serilerinden geçirilerek

hematoksilen-eosin (HE) ile metoduna göre boyanmıştır. (Luna, 1968). Boyamaları yapılan preparatlar, binokuler başlıklı ışık mikroskopunda (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japan) incelenmiştir. Gerekli görülen preparatlardan mikroskopik resimler çekilmiştir. (Nikon DS Fİ3, Microscopic Digital Camera Systems, Tokyo, Japan).

2.5. Gen Ekspresyon Analizleri

2.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu

30 mg doku RNAase free ependorflara tartılmıştır. 300 µl Lysis Buffer Solüsyonu eklendi, preslenerek parçalanmıştır ve 10 sn. vortekslenmiştir. 600 µl Proteinaz K solüsyonu eklenmiştir ve 24,5°C de 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk. 12000 g' de +4 ° C de santrifüj edilmiştir ve yeni RNAase free tüplere aktarılmıştır. 450 µl ethanol (96-100 %) eklendi ve pipetlenmiştir. 700 µl solüsyondan alınarak filtreli coloumn tüplere aktarılmıştır. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir. Çıkan tüpün alt kısmı dökülmüştür, üst kısmına kalan solüsyon aktarılmıştır. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir.

700 µl Wash Buffer 1 solüsyonu eklenmiştir. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir, alt kısmı dökülmüştür. 600 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenmiştir. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir, alt kısmı dökülmüştür. 250 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenmiştir. 2 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir, alt kısımları yeni RNAase free ependorflarla değiştirilmiştir. 100 µl Nuclease-free water eklenmiştir, 2 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir. Daha sonra tekrar 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edilmiştir. İzole edilen RNA 'lar -70 ° C de saklanmıştır. Bu çalışmanın tüm aşamaları buz üzerinde yapılmıştır.

Lysis Buffer Solüsyonu: 1200 µl Lysis Buffer Solüsyonu

25 µl Mercaptoethanol

Proteinaz K solüsyonu: 10 µl Proteinaz K

590 µl Water

Wash Buffer 1 solüsyonu: 8 µl Wash Buffer 1

2 µl ethanol

Wash Buffer 2 solüsyonu: 4600 µl Wash Buffer 2

7800 µl ethanol

2.5.2. Real Time PCR Analizleri

Her bir kuyu için 5 µl SYBR green master mix (Promega), 0,2 µl Primer karışımı (Forward ve Reverse, 10 pmol) ve 2,8 µl nukleaz içermeyen distile sudan alınıp bir PCR reaksiyon ortamı hazırlanmıştır. Real-time mikropate üzerindeki kuyucuklara 2 µl cDNA örnekleri dağıtıldıktan sonra, hazırlanan bu karışım eklenmiştir. Ardından PCR mikropate film ile kaplanarak, 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Light cycler Roche 480 cihazında aşağıdaki reaksiyon basamakları izlenerek real-time PCR gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon basamakları ise şöyledir;

Pre-inkübasyon: 95°C 10 dakika

Amplifikasyon: 95°C 10 saniye

Bağlanma: 55 °C 30 saniye

Uzama: 72°C 1 dakika

2.5.3. Data Analizleri

Analiz LightCycler 480 cihazının 465-510 kanalı kullanılarak yapılmıştır. Rölatif kantitasyon analizi ile elde edilen değerler (Target gene / referans gen) kullanılarak, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin değişim oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanarak grafik oluşturulmuştur (Pfaffl 2001). Hesaplama $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ App}) \text{ denek grubu} - (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ App}) \text{ kontrol grubu}$ formülünden yararlanılmıştır.

2.5.4. Kullanılan Primerler

β -actin: NC 005111.4 Rattus norvegicus (kontrol geni)

F 5': GAGGGAAATCGTGCGTGACAT 3'

R 5': ACATCTGCTGGAAGGTGGACA 3'

cc2d1a: NM_001013869.1Rattus norvegicus (225 bp-360 bp)

F : CTGCTGGTTGACTTCTCCCC

cc2d1a R : AGGGGACCTTTGCCTTTCAG

Caspaz 3: NM_012922 Rattus norvegicus

F: 5'-GTGGAAGTACGATGATATGGC-3'

R: 5'-CGCAAAGTACTGGATGAACC-3'

2.6. ELISA Ölçümleri

2.6.1. Rat Beyin Dokusu Homojenizasyonu

Ratlardan alınan beyin dokuları beyin hipokampus, beyin sapı ve kortekslerinde; Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF α), İnterlökin6 (IL6), İnterlökin1 Beta (IL1 β), Kaspaz3 (Casp3), Glutasyon Peroksidaz (GPX), ve Malondialdohit (MDA), ELISA test ölçümleri için dokuların ağırlığına göre 1/10 (ağırlık/volüm) oranında fosfat tampon çözeltisi (PBS) (0,1 M / pH: 7,4) eklenip doku homojenizatörü ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 10 dk 2000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları ayrılmıştır, ve ependorf tüplere alınarak -80 °C' derin dondurucuda analizlerin yapılacağı zamana kadar saklanmıştır.

2.6.2. ELISA Ölçümlerinin Uygulanması

ELISA Testleri aşağıda markalarıve üretici firmaları veirlmiş olan üretici firmaların direktiflerine göre çalışmıştır.

GPX, MDA, CASP3 (Elabscience, Inc., Houston , TX, USA)

TNFA, IL1 β , IL6 (USCN, Business Co., Ltd. Wuhan, China)

Yıkayıcı cihaz olarak BioTek 50 Microplate Washer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA)

ELISA okuyucu cihazı olarak ise BioTek 800 Microplate Reader

(BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA) cihazı kullanılmıştır.

Bütün testlere ait okumalar 450 nm dalga boyunda yapılarak optik dansite (OD) değerleri elde edilmiştir. Elde edilen optik dansite değerleri ithalatçı firma tarafından kullanılan program (Radım Alisei Q.S. Fully Automatic Microtiter Plates ELISA Analyzer, RADIM Diagnostics, Italy) aracılığı ile sonuç verilerine dönüşümü sağlanmıştır.

2.6.3. ELISA Çalışma Protokolü-1 (TNFA, IL1 β , IL6)

Reaktif Hazırlama

1-Kullanmadan önce tüm kit bileşenlerini ve örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Kit tek seferde kullanılmayacaksa, lütfen yalnızca gerekli durumdaki stripleri ve reaktifleri çıkarılmıştır.

2- Standart Çalışma Solüsyonu Hazırlama: Standart Dilüentten 500 mikrolite alındı ve standart sulandırılarak vortekslenildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. 7 adet tüpe 250 mikrolite Sample dilüent eklenmiştir. Hazırladığımız solüsyondan 250 mikrolitrelik seri dilüsyonlar yapılmıştır. 6. tüpe kadar seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. 6. tüpten alınan 250 mikrolitre çöpe aktarılmıştır. 7. tüpe bir işlem yapılmamıştır.

3-Saptama Reaktifi A ve Saptama Reaktifi B Hazırlama: Kullanmadan önce stok Saptama A ve Saptama B vortekslenmiştir. Saptama A reaktifi için; Çalışmada kullanılacak örnek sayısı kadar 1 mikrolitre konsantre A konjugat ve 99 mikrolitre oranında A konjugat dilüent eklenmiştir. Saptama B reaktifi için; Çalışmada kullanılacak örnek sayısı kadar 1 mikrolitre konsantre B konjugat ve 99 mikrolitre oranında B konjugat dilüent eklenmiştir.

4- Yıkama Tamponu Hazırlama: 20 mL Konsantre Yıkama Tamponu 580 mL deiyonize veya distile su ile seyreltilmiştir..

5-TMB substratı hazırlama: Substrata pipetaj yapıldı ve ayrı bir tüpe kullanılacak miktar kadar alınmıştır. Substrat şişesi içinden dağıtım yapılmamıştır.

ELISA Test Prosedürü

1. Tüm reaktifleri, örnekleri ve standartları hazırlanmıştır.
2. Seri dilüsyonlarla hazırlanmış standart solüsyonlarından 1. 3. 5. 7. Ve 8. Tüp ilk 5 kuyucuğa 100 mikrolitre dağıtılmıştır. Daha sonra örnekler diğer kuyucuklara 100 mikrolitre olarak dağıtılmıştır. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Kuyucuklar aspire edilmiştir ve herhangi bir işlem yapılmamıştır. Ardından 100 mikrolitre Saptama Reaktifi A 100 mikrolitre her kuyucuğa dağıtılmıştır. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılmıştır 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
4. BioTek 50 Microplate Washer (Winooski, Amerika) yıkama cihazı ile 3 kez 300 mikrolitre yıkama yapılmıştır.
5. 100 mikrolitreSaptama Reaktifi B 100 mikrolitre her kuyucuğa dağıtılmıştır. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
6. BioTek 50 Microplate Washer (Winooski, Amerika)yıkama cihazı ile 5 kez 300 mikrolitre yıkama yapılmıştır.
7. Her kuyucuğa 90 mikrolitre Substrat Reaktifi eklenmiştir. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 10-20 dakika inkübe edilmiştir.
8. Her kuyuya 50 mikrolitre Durdurma Solüsyonu eklenmiştir.
9. 450 nm'ye ayarlanmış BioTek 800 Microplate Reader (Bio Tek Inc., Winooski, VT, USA) okuyucu cihazı ile her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) bir defada belirlenmiştir.

2.6.4. ELISA Çalışma Protokolü-2 (GPX, MDA, CASP3)

Reaktif Hazırlama

1. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına (18 ~ 25 ° C) getirilmiştir. Kurulum için Mikroplak okuyucu kılavuzu takip edildi ve OD ölçümünden önce 15 dakika önceden ısıtılmıştır.
2. Yıkama Tamponu Hazırlama: 30 mL Konsantre Yıkama Tamponu 720 mL deiyonize veya distile su ile seyreltilmiştir.
3. Standart Çalışma Solüsyonu Hazırlama: Standardı 1 dakika boyunca 10.000 × g'de santrifüjlendi. 1000 mikrolitre sample dilüent konsantre standart üzerine eklenmiştir, vortekslenmiştir, 10 dakika bekletilmiştir. Bu sulandırma, 2000 pg / mL'lik bir çalışma solüsyonu üretilmiştir. Yedi adet tüpe 500 mikrolite Sample dilüent eklenmiştir. Hazırladığımız 2000 pg / mL'lik solüsyondan 500 mikrolitrelik seri dilüsyonlar yapılmıştır. 6. tüpe kadar seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Altıncı tüpten alınan 500 mikrolitre çöpe aktarılmıştır. Yedinci tüpe bir işlem yapılmamıştır.
4. Biotinlenmiş Antikor Belirleme Solüsyonu Hazırlama: Çalışmada kullanılacak örnek sayısı x 50 mikrolitre biyotinlenmiş antikor belirleme seyrelticiinden stok solüsyonu hazırlanarak 5 dk vortekslenmiştir. Daha sonra Çalışmada kullanılacak örnek sayısı kadar konsantre biyotinlenmiş antikor belirleme solüsyonundan 1 mikrolitre ve biyotinlenmiş antikor belirleme solüsyonundan 99 mikrolitre oranında eklenerek ayrı bir tüpde solüsyon hazırlanmıştır.
5. Konsantre HRP Konjugat Solüsyonu Hazırlama: Çalışmada kullanılacak örnek sayısı kadar 1 mikrolitre HRP konsantre konjugat ve 99 mikrolitre oranında HRP konjugat dilüent eklenmiştir.

ELISA Test Prosedürü

1. Seri dilüsyonlarla hazırlanmış standar solüsyonlarından 1. 3. 5. 7. Ve 8. tüp ilk 5 kuyucuğa 100 mikrolitre dağıtılmıştır. Daha sonra örnekler diğer kuyucuklara 100 mikrolitre olarak dağıtılmıştır. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 90 dakika inkübe edilmiştir.

2. Kuyucuklar iaspire edilmiştir ve herhangi bir işlem yapılmamıştır. Ardından 100 µL biyotinlenmiş antikor belirleme solüsyonu 100 mikrolitre her kuyucuğa dağıtılmıştır. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

3. BioTek 50 Microplate Washer (Bio Tek Inc., Winooski, VT, USA) yıkama cihazı ile 3 kez 300 mikrolitre yıkama yapılmıştır.

4. Her kuyucuğa 100 mikrolitre Konsantre HRP konjugat solüsyonu eklenmiştir. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

5. BioTek 50 Microplate Washer (Bio Tek Inc., Winooski, VT, USA) yıkama cihazı ile 5 kez 300 mikrolitre yıkama yapılmıştır.

6. Her kuyucuğa 90 mikrolitre substrat reaktifi eklenmiştir. Mikropileytin üzeri yapışkan ile kapatılarak 37 ° C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

7. Her kuyuya 50 mikrolitre durdurma solüsyonu eklenmiştir.

8. 450 nm'ye ayarlanmış BioTek 800 Microplate Reader (Bio Tek Inc., Winooski, VT, USA) okuyucu cihazı ile her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) bir defada belirlenmiştir.

ELISA testlerinden elde edilen OD değerleri kitlerin üreticisi firmaya ait olan program aracılığı ile kesin sonuç değerleri hesaplanmıştır.

2.7. İstatistik Analizleri

Araştırmada, Davranış sonuçlarının analizinde 64 hayvandan veri toplanmıştır. Toplanan verilerin analizinde tekrarlı ölçümler anova analizi (Repeated Measures) testi uygulanmıştır. Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22.0 programı ile analiz edilmiştir. Verilerin analizinde deneklerimizin gün gün tekrarlı ölçümümüz olduğu için veri setimize uygun olarak tekrarlı ölçüm anova testi uygulanmıştır. Sphericity (küresellik varsayımı) testi yapılmış olup çıkan değere göre küresellik varsayımı karşılanıp karşılanmadığı test edilmiştir. Her tablodan önce ilk sphericity testine bakılıp çıkan değer anlamlılık

durumuna göre Sphericity Assumed Greenhouse-Geisser Huynh-Feldt analizi ile çıkan 3 farklı değerden anlamlı olan değerlendirmeye alınmıştır.

2.7.1. Davranış Testleri Verileri Analizi

Araştırmada, 64 hayvandan veri toplanmıştır. Toplanan verilerin analizinde tekrarlı ölçümler anova analizi (Repeated Measures) testi uygulanmıştır. Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22.0 programı ile analiz edilmiştir.

2.7.2. ELISA Verileri Analizi

Veriler IBM SPSS 20.0 programında analiz edildi. Veriler normal dağılış göstermediğinden iki bağımsız grup karşılaştırmaları Mann-Whitney U, ikiden çok bağımsız grup karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile test edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.8. Water Maze Testinin Yapılışı (Morris Su Labirenti Testi, Öğrenme Testi)

Öğrenmeyi test etmek amacıyla önceden hazırlatılan Richard Morris tarafından geliştirilen Morris su labirenti kullanıldı. Richard Morris tarafından geliştirilen Morris su labirenti uzamsal hafızayı test etmek için tasarlanmış bir davranış deneyidir. Morris su labirenti, içerisinde gizli bir platformu bulunduran, içi su dolu, geniş, sirküler bir tanktır. Tankın çapı 120 cm, yüksekliği 60 cm, su yüksekliği 40 cm. dir. Morris su tankı 24-26 derece su ile doldurulmuştur. Platform su yüzeyinden 5 cm derine yerleştirilmiş olup, çapı 10 cm, havuz kenarından uzaklığı ise 17 cm.dir. Platformun üstü ise ratların tutunmasını sağlayacak ve kendisini güvende hissedeceği şekilde lifli bir kumaşla kaplanmıştır (Shultz v.d.,2013).



Resim 1: Water Maze Testi Platformu.

3. BULGULAR

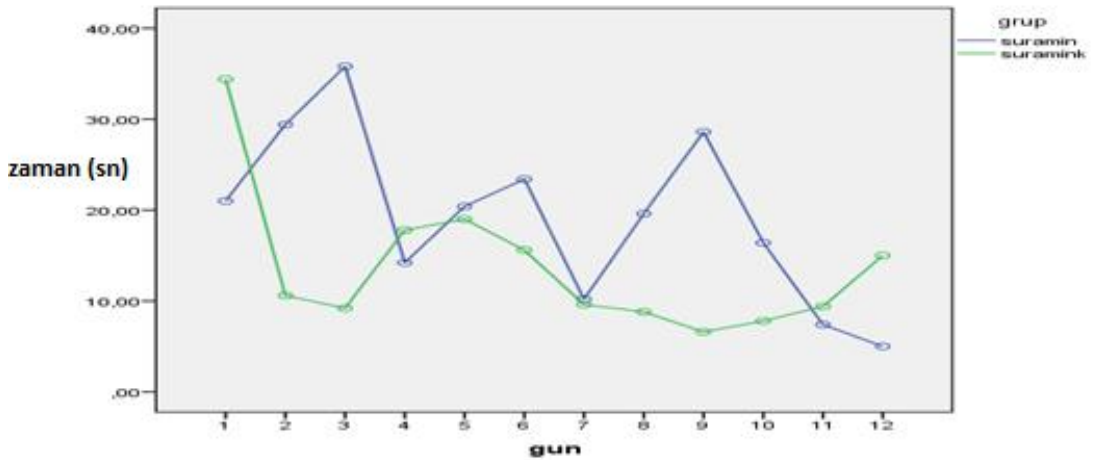
3.1. Davranış Testi Bulguları

Çizelge 3.1: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.

		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	11	336,770	2,066	,031
	Greenhouse-Geisser	3,240	1143,478	2,066	,015
	Huynh-Feldt	6,385	580,151	2,066	,070
	Lower-bound	1	3704,467	2,066	,189
gun*grup	Sphericity Assumed	11	389,652	2,391	,012
	Greenhouse-Geisser	3,240	1323,034	2,391	,028
	Huynh-Feldt	6,385	671,250	2,391	,038
	Lower-bound	1	4286,167	2,391	,161

P<0,05

Çizelge 3.1'de sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu arasında yapılan ölçümlere yönelik tekralı ölçüm anavo testi sonuçları verilmiştir. Buna göre ölçümler arasında fark tespit edilmiştir. Suramin ve suramin kontrol grubu arasında süreler bakımından anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). (Suramin verilmesi davranış testlerinde istatistiksel anlamlı fark olacak derecede olumsuz etki oluşturmuştur).



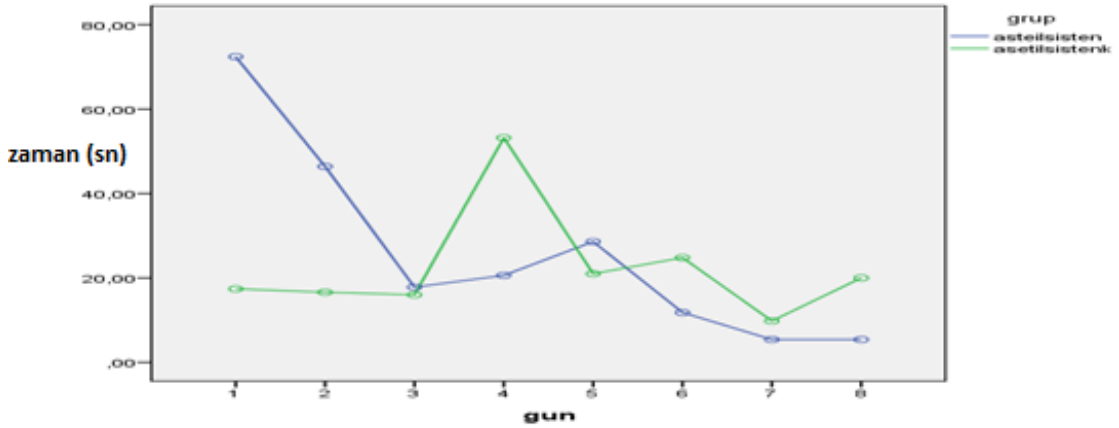
Şekil 3.1: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.

Çizelge 3.2: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.

		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	7	1627,629	2,012	,070
	Greenhouse-Geisser	2,759	4129,086	2,012	,145
	Huynh-Feldt	4,884	2333,032	2,012	,100
	Lower-bound	1,000	11393,400	2,012	,194
gun*grup	Sphericity Assumed	7	1903,143	2,352	,035
	Greenhouse-Geisser	2,759	4828,031	2,352	,104
	Huynh-Feldt	4,884	2727,952	2,352	,060
	Lower-bound	1,000	13322,000	2,352	,164

P>0,05

Çizelge 3.2’de sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Yapılan çalışmada N-Asetilsistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu ölçümlerine yönelik tekrarlı ölçüm anavo testi sonuçları verilmiştir. Buna göre ölçümler arasında fark tespit edilmemiştir (p>0,05).



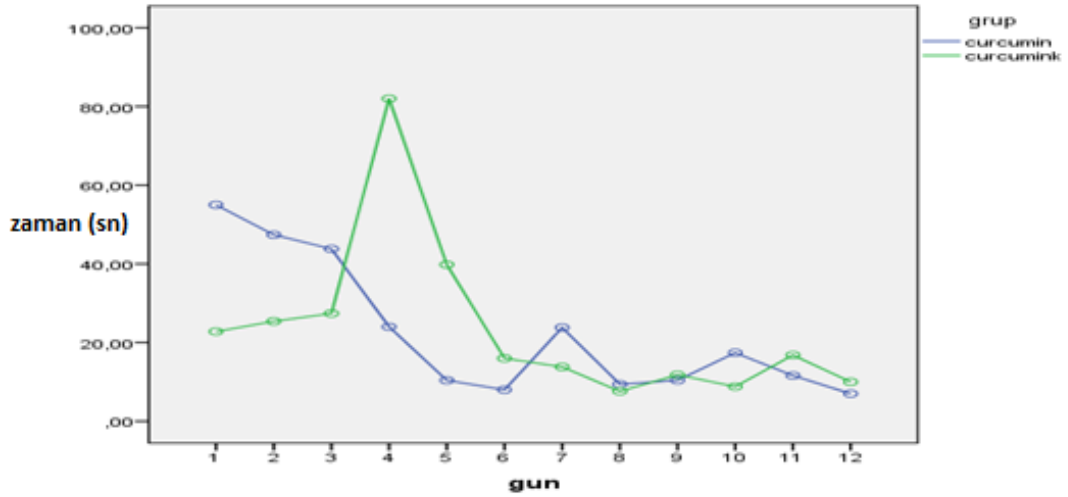
Şekil 3.2: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.

Çizelge 3.3: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.

		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	11	2156,079	6,573	,000
	Greenhouse-Geisser	4,064	5835,226	6,573	,061
	Huynh-Feldt	9,819	2415,347	6,573	,000
	Lower-bound	1,000	23716,867	6,573	,033
gun*grup	Sphericity Assumed	11	1427,506	4,352	,000
	Greenhouse-Geisser	4,064	3863,412	4,352	,076
	Huynh-Feldt	9,819	1599,163	4,352	,000
	Lower-bound	1,000	15702,567	4,352	,070

p<0,05

Çizelge 3.3'de sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Görüldüğü üzere Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu ölçümlerine yönelik tekrarlı ölçüm anavo testi sonuçları verilmiştir. Buna göre ölçümler arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0,05).



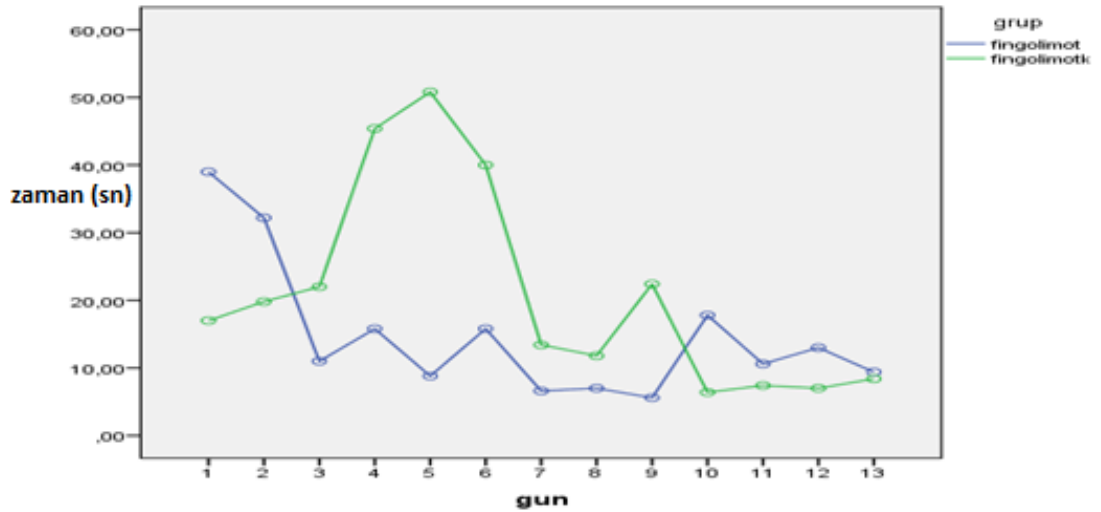
Şekil 3.3: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.

Çizelge 3.4: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.

		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	12	815,492	3,375	,000
	Greenhouse-Geisser	3,359	2912,952	3,375	,029
	Huynh-Feldt	6,808	1437,341	3,375	,005
	Lower-bound	1,000	9785,908	3,375	,103
gun*grup	Sphericity Assumed	12	839,744	3,476	,000
	Greenhouse-Geisser	3,359	2999,578	3,476	,026
	Huynh-Feldt	6,808	1480,084	3,476	,004
	Lower-bound	1,000	10076,923	3,476	,099

p<0,05

Çizelge 3.4'de sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu havuzdan çıkış süreleri karşılaştırılmasının sonuçları verilmiştir. Tablo ya göre anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0,05).



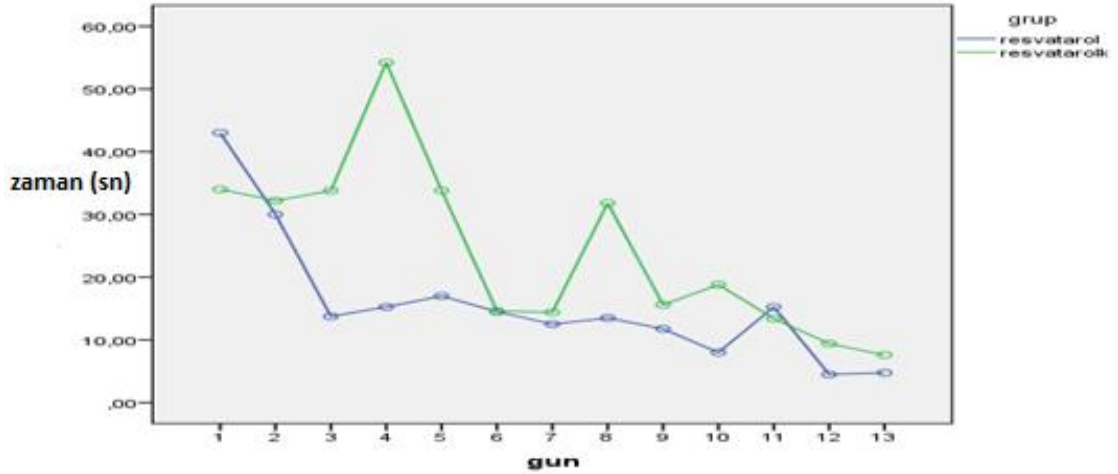
Şekil 3.4: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.

Çizelge 3.5: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Karşılaştırması.

		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	12	949,921	5,136	,000
	Greenhouse-Geisser	3,632	3138,109	5,136	,004
	Huynh-Feldt	9,114	1250,704	5,136	,000
	Lower-bound	1,000	11399,050	5,136	,058
gun*grup	Sphericity Assumed	12	345,274	1,867	,050
	Greenhouse-Geisser	3,632	1140,629	1,867	,042
	Huynh-Feldt	9,114	454,602	1,867	,073
	Lower-bound	1,000	4143,289	1,867	,214

p<0,05

Çizelge 3.5'de sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Çizelge 3.5 incelendiğinde Resvatarol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu havuzdan çıkış süreleri karşılaştırılmasının sonuçları verilmiştir. Çizelge 3.5'e göre anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0,05).



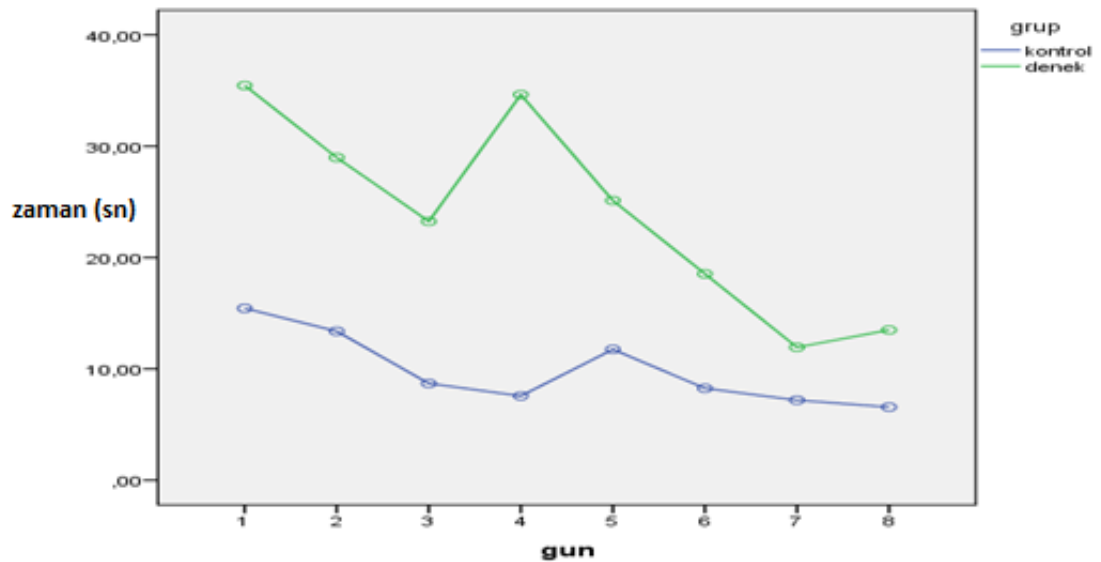
Şekil 3.5: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu.

Çizelge 3.6: Hastalık Grubu ve Kontrol Grubu Karşılaştırması.

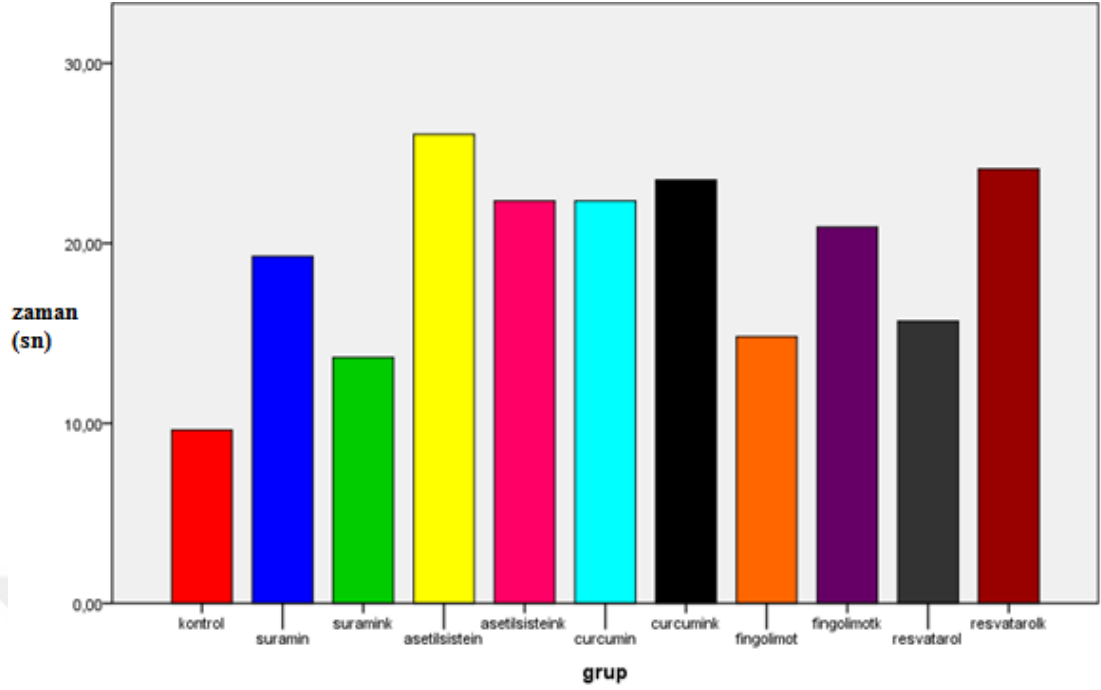
		df	Mean Square	F	Sig.
gun	Sphericity Assumed	7	1554,422	3,843	,000
	Greenhouse-Geisser	4,333	2511,041	3,843	,004
	Huynh-Feldt	4,767	2282,587	3,843	,003
	Lower-bound	1,000	10880,951	3,843	,054
gun*grup	Sphericity Assumed	7	619,619	1,532	,0154
	Greenhouse-Geisser	4,333	1000,945	1,532	,039
	Huynh-Feldt	4,767	909,879	1,532	,073
	Lower-bound	1,000	4337,	1,532	,220

p<0,05

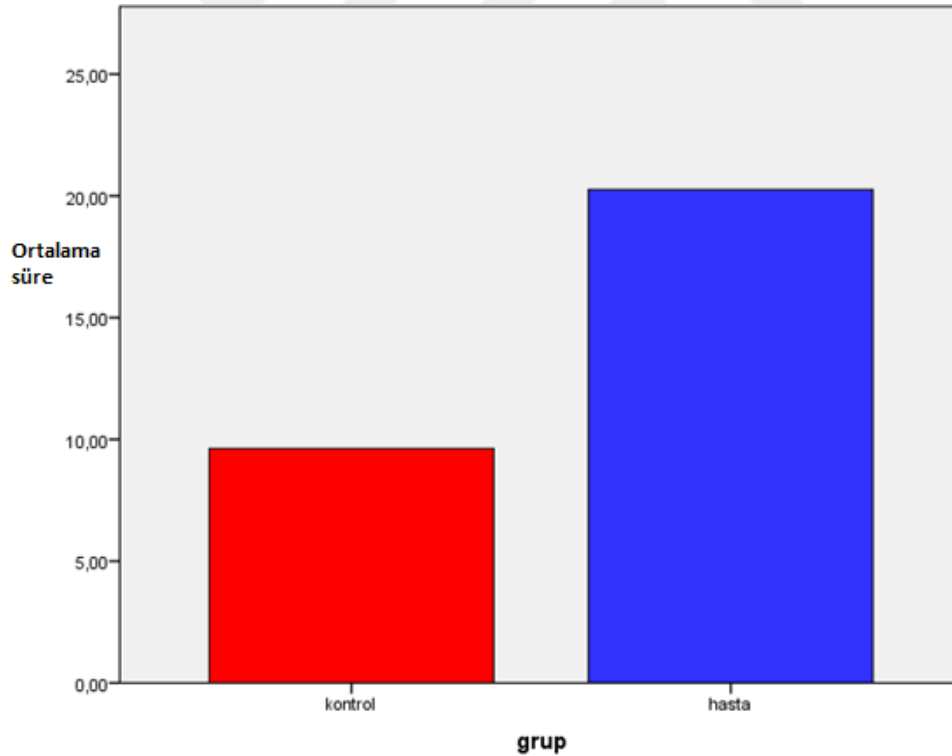
Çizelge 3.6'da sphericity var sayımı karşılanmadığı için Greenhouse-Geisser değeri dikkate alınmıştır. Çizelge 3.6 incelendiğinde Hastalık Grubu ve Kontrol Grubu havuzdan çıkış süreleri karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak sonuçları verilmiştir. Çizelgeye göre anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0,05).



Şekil 3.6: Hastalık Grubu ve Kontrol Grubu Karşılaştırması.

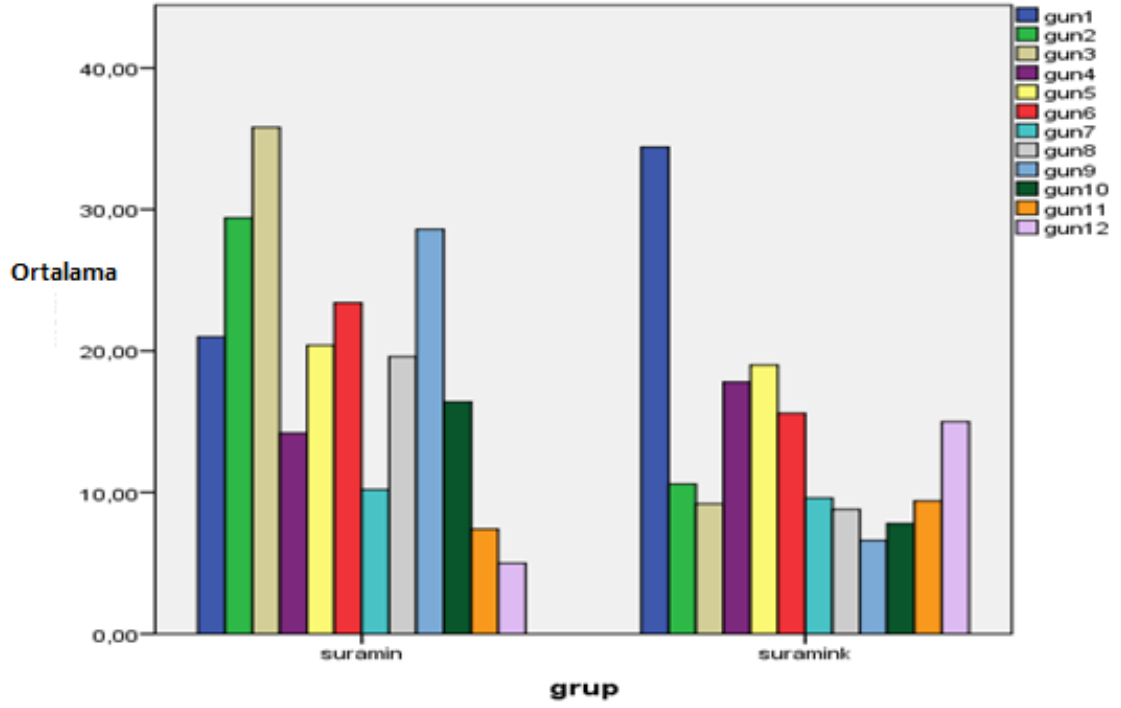


Şekil 3.7: Her Grubun Ortalama Değerlerinin Karşılaştırması.

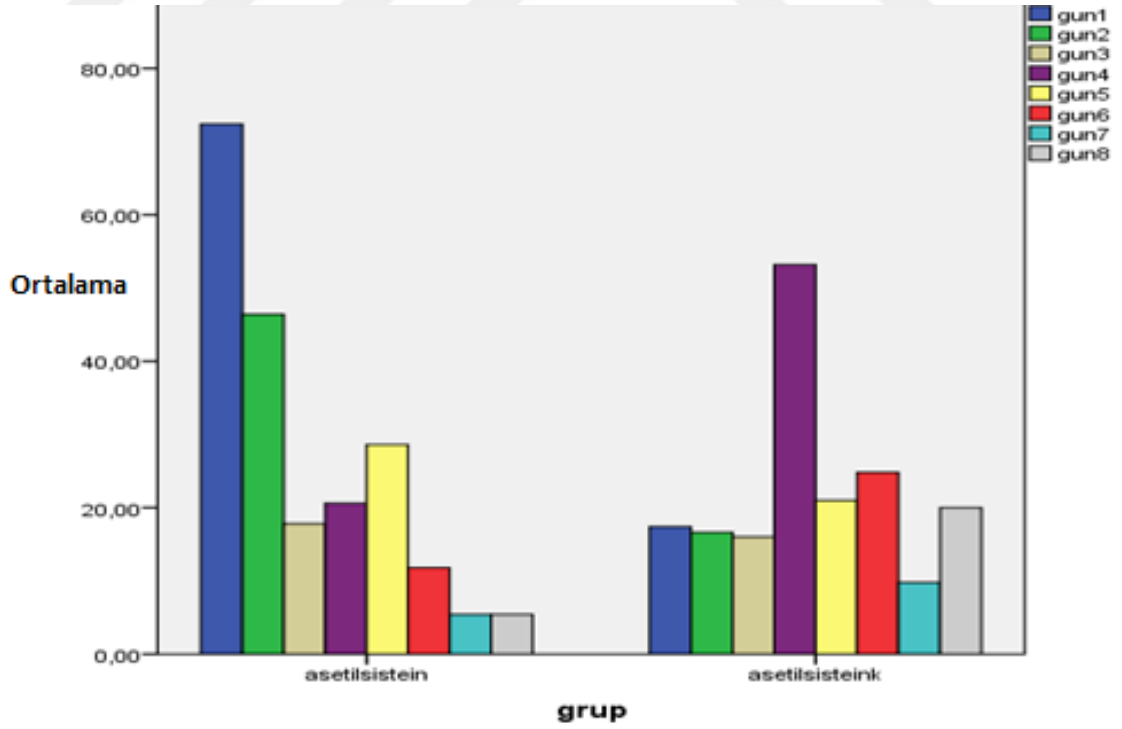


Şekil 3.8: Kontrol Grubu ve Hastalık Grubu Ortalamalarının Karşılaştırması.

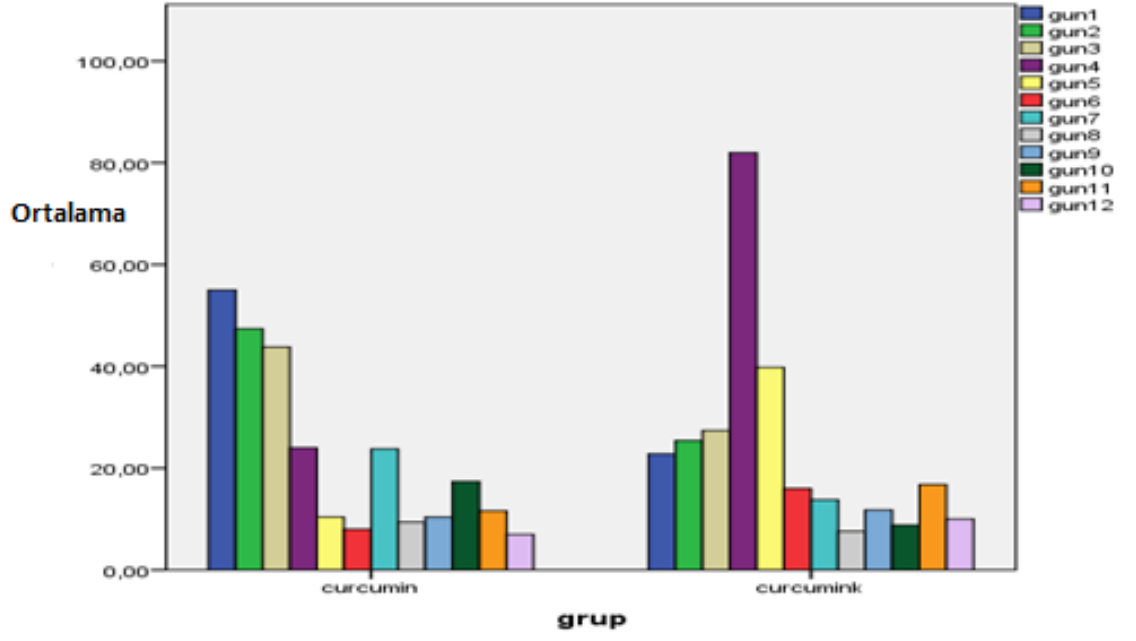
Verilerin analizinde deneklerimizin gün gün tekrarlı ölçümümüz olduğu için veri setimize uygun olarak tekrarlı ölçüm anova testi uygulanmıştır. Sphericity (küresellik varsayımı) testi yapılmış olup çıkan değere göre küresellik varsayımı karşılanmadığı görülmüştür.



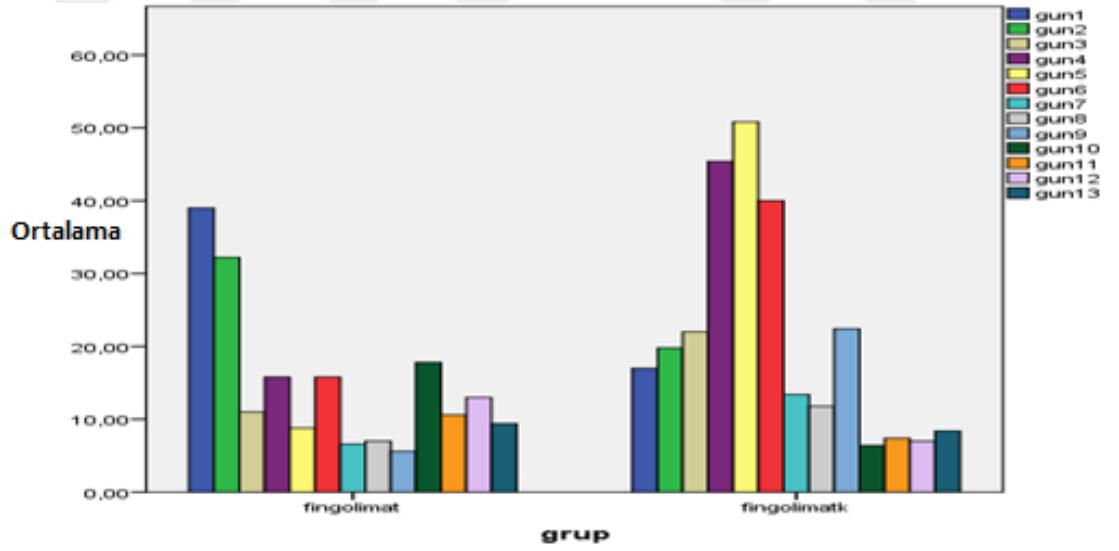
Şekil 3.9: Suramin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubunun Gün Gün Karşılaştırması (Her Renk 1 Günü İçermektedir).



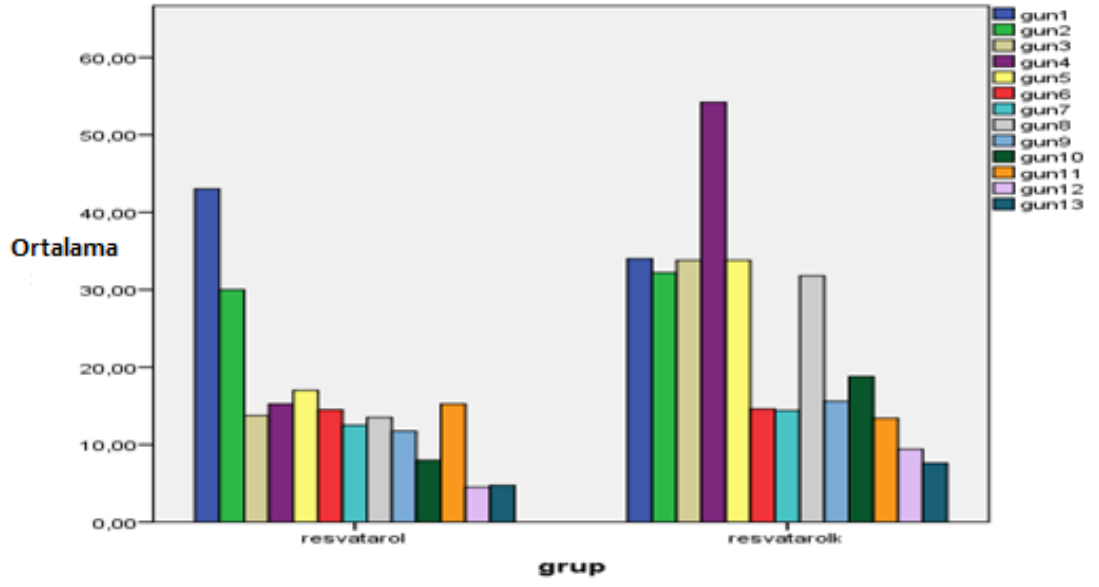
Şekil 3.10: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.



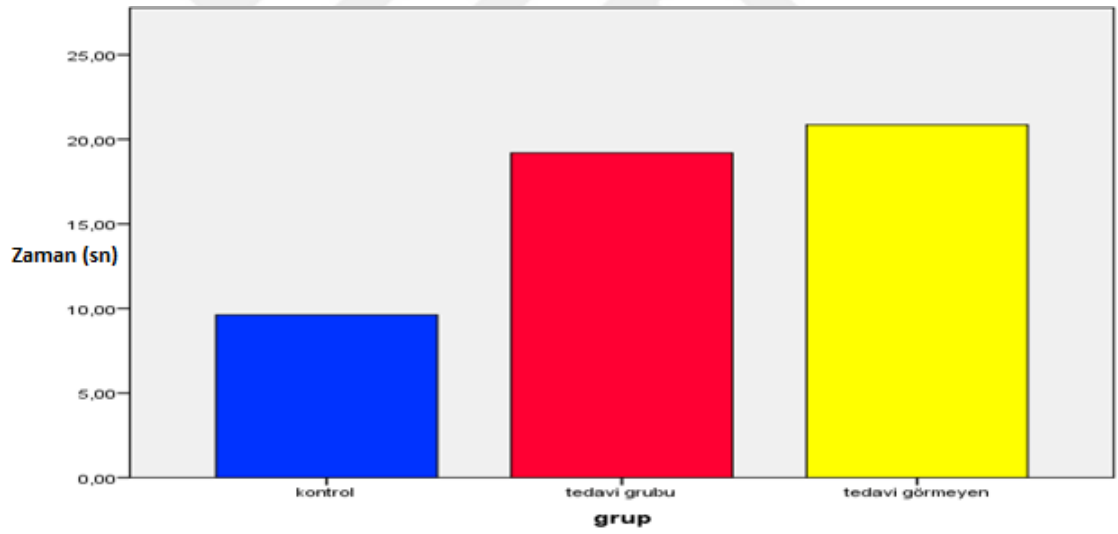
Şekil 3.11: Kurkumin Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.



Şekil 3.12: Fingolimod Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.



Şekil 3.13: Resveratrol Tedavi Grubu ve Tedavi Kontrol Grubu Gün Gün Karşılaştırması.



Şekil 3.14: Grupların Bütün Olarak Karşılaştırmaları.

3.2. ELISA Ölçümlerine Ait Bulgular

Çizelge 3.7: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları ELISA Test Sonuçları Ortalama Değerleri Karşılaştırması.

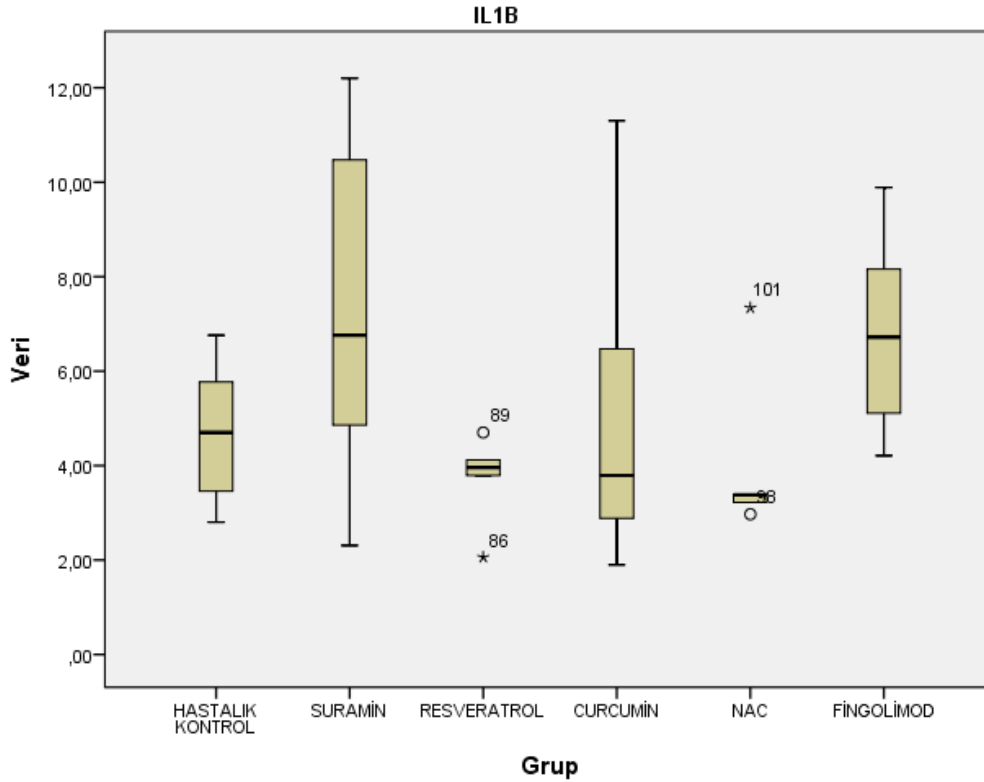
ELISA TESTİ	GRUP	Min	Max	Range	Median	Test İst.	p
IL1B (pg/mL)	HASTALIK KONTROL	2,80	6,76	3,96	4,70	9,706	0,084
	SURAMİN	2,31	12,20	9,89	6,76		
	RESVERATROL	2,06	4,70	2,64	3,96		
	CURCUMİN	1,90	11,30	9,40	3,79		
	N-ASETİL SİSTEİN	2,97	7,34	4,37	3,38		
	FİNGOLİMOD	4,21	9,89	5,68	6,72		
IL6 (pg/mL)	HASTALIK KONTROL	,46	2,08	1,62	1,01	3,394	0,640
	SURAMİN	,77	2,30	1,53	1,32		
	RESVERATROL	,86	4,35	3,49	1,13		
	CURCUMİN	,40	6,04	5,64	2,36		
	N-ASETİL SİSTEİN	,58	2,21	1,63	1,38		
	FİNGOLİMOD	,80	3,10	2,30	1,34		
TNF ALFA (pg/mL)	HASTALIK KONTROL	8,47	13,44	4,97	9,92	7,060	0,216
	SURAMİN	9,92	19,04	9,12	15,93		
	RESVERATROL	13,44	18,42	4,98	15,31		
	CURCUMİN	9,51	20,70	11,19	12,82		
	N-ASETİL SİSTEİN	9,30	22,17	12,87	14,07		
	FİNGOLİMOD	6,20	28,39	22,19	14,59		
GPX (pg/mL)	HASTALIK KONTROL	36,64	58,19	21,55	45,26 ^a	13,933	0,016*
	SURAMİN	47,41	80,82	33,41	65,73 ^{ab}		
	RESVERATROL	59,27	685,98	626,71	64,66 ^{ab}		
	KURCUMİN	59,27	76,84	17,57	68,37 ^{ab}		
	N-ASETİL SİSTEİN	48,49	93,08	44,59	68,87 ^{ab}		
	FİNGOLİMOD	63,58	97,76	34,18	72,10 ^b		
MDA (ng/mL)	HASTALIK KONTROL	18,92	36,69	17,77	21,95	5,234	0,388
	SURAMİN	8,45	30,14	21,69	17,09		
	RESVERATROL	22,25	36,80	14,55	26,03		
	CURCUMİN	8,57	39,03	30,46	31,36		
	N-ASETİL SİSTEİN	17,16	57,04	39,88	32,47		
	FİNGOLİMOD	5,04	49,70	44,66	35,31		
CASP3 (ng/mL)	HASTALIK KONTROL	,21	,66	,45	,29 ^a	12,381	0,030*
	SURAMİN	,19	,46	,27	,29 ^a		
	RESVERATROL	,24	,62	,38	,40 ^{ab}		
	KURCUMİN	,24	,59	,35	,38 ^{ab}		
	N-ASETİL SİSTEİN	,36	,54	,18	,42 ^{ab}		
	FİNGOLİMOD	,28	1,14	,86	,62 ^b		

(IL1 β ; İnterlökın 1 Beta, IL6;İnterlökın 6, TNF α ; Tümör Nekrozis Faktör Alfa, GPX; Glutasyon Peroksidaz, MDA; Malondialdehit, CASP3; Kaspaz 3). (Hastalık Kontrol Grubu = Tedavi Kontrol Grubu)

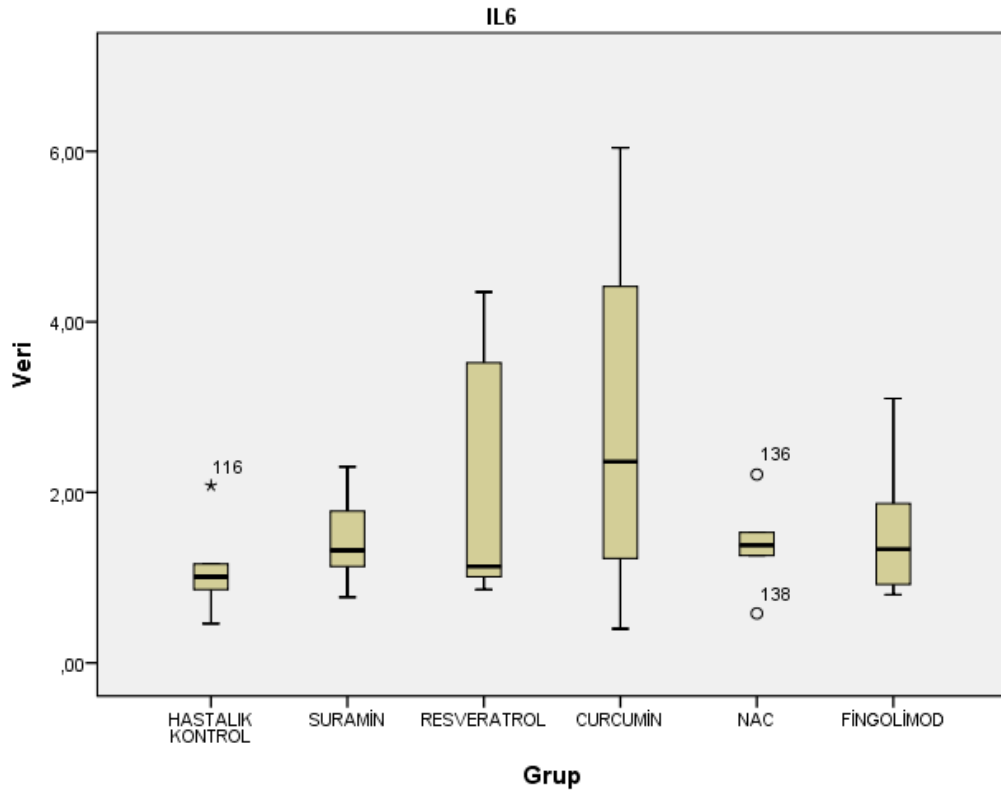
Çizelge 3.7'ye göre Tedavi için kullanılan beş etken maddelerden, araştırılan altı çeşit ELISA test markerline karşı sadece Fingolimod Tedavi Grubunda; GPX ve CASP3 için Hastalık Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). GPX veCASP3 için Fingolimod Tedavi Grubu ile Hastalık Kontrol Grubu arasında istatistiki önemli farklılık vardır ($p<0,05$).

Diğer dört Tedavi Grupları (Suramin, Resvareatrol, Kurkumin, ve N-Asetil sistein) ile Hastalık Kontrol Grubu arasında ise incelenen diğer beş adet ELISA testlerinde (IL-1 β , IL-6, TNF- α ve MDA) istatistiki önemli bir farklılık bulunmamıştır. ($p>0,05$).

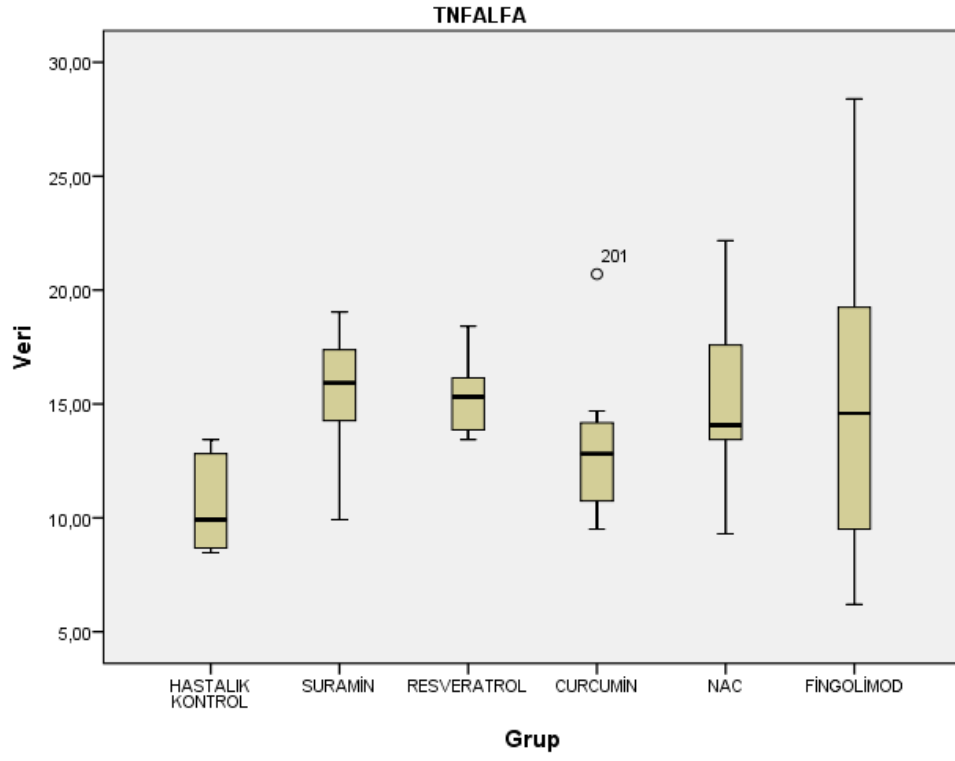
IL-1B, IL-6, TNF ALFA ve MDA için ortanca ELISA testleri sonuçlarına göre bütün tedavi grupları ile hastalık kontrol grupları arasında istatistiki önemli (anlamlı) bir farklılık yoktur ($p>0,05$).



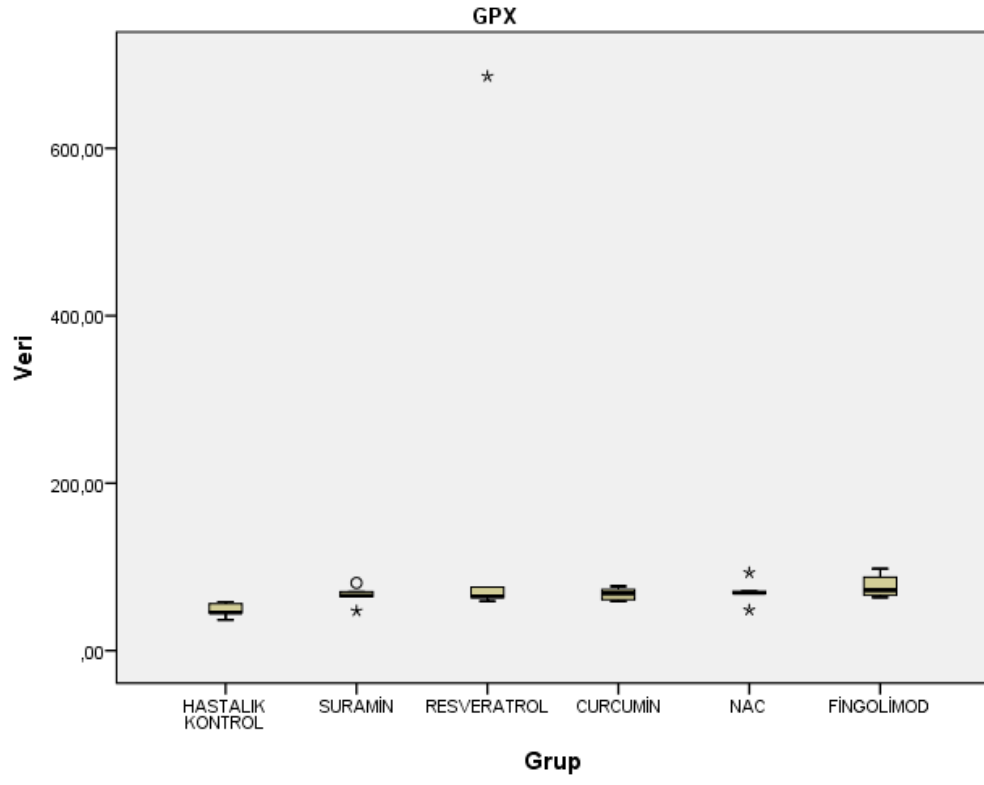
Şekil 3.15: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları İnterlökın 1 Beta (IL1 β pg/mL) ELISA Test Sonuçları.



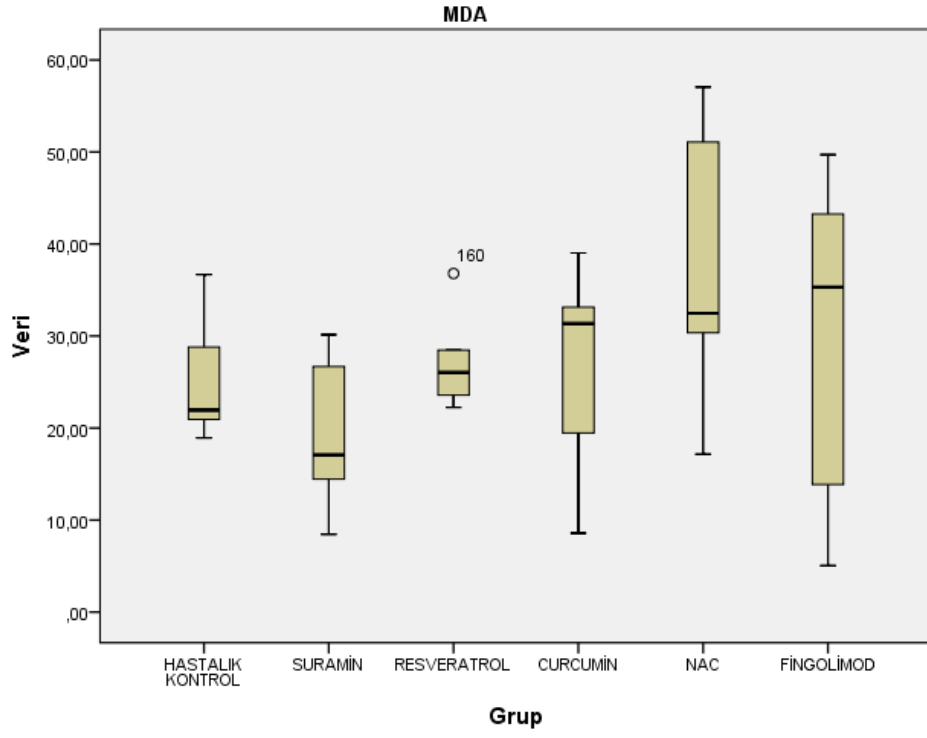
Şekil 3.16: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları İnterlökin 6 (IL6 pg/mL) ELISA Test Sonuçları.



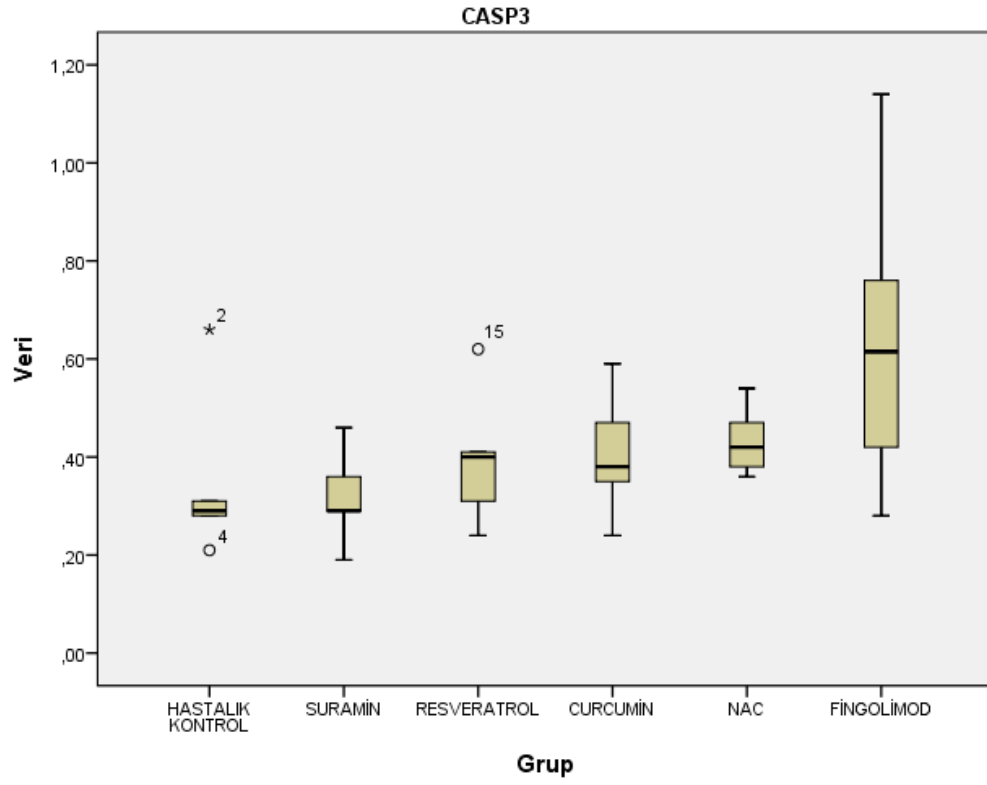
Şekil 3.17: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF α pg/mL) ELISA Sonuçları.



Şekil 3.18: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Glutasyon Peroksidaz (GPX pg/mL) ELISA Sonuçları.

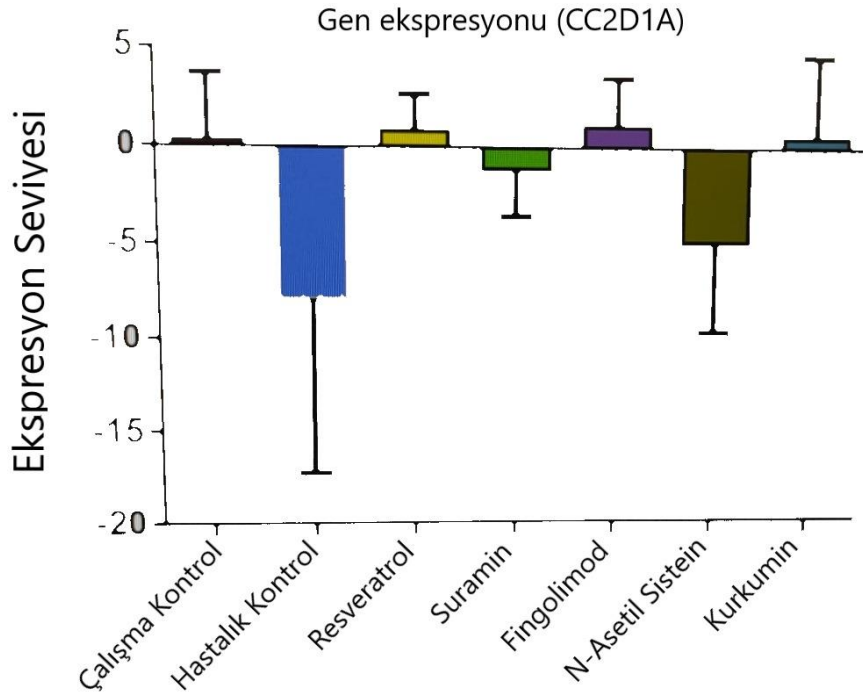


Şekil 3.19: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Malondialdohit (MDA ng/mL) ELISA Sonuçları.



Şekil 3.20: Hastalık Kontrol Grubu ve Tedavi Grupları Kaspaz 3 (CASP3 ng/mL) ELISA Sonuçları.

3.21. CC2D1A Geni mRNA Ekspresyon Bulguları



Şekil 3.21: Hastalık Kontrol Grubu ile Tedavi Grupları CC2D1A Geni mRNA Ekspresyon Karşılaştırması.

Çizelge 3.8: Hastalık Kontrol Grubu ile Tedavi Grupları CC2D1A Geni mRNA Ekspresyonu İstatistikî Karşılaştırması.

Hastalık Kontrol Grubu / Tedavi Grubu	Önem Değeri	P-Değeri
Hastalık Kontrol / Resveratrol	0.0499*	P<0.05
Hastalık Kontrol / Suramin	0.1184	P>0.05
Hastalık Kontrol / Fingolimod	0.0061*	P<0.05
Hastalık Kontrol / NAC	0.5107	P>0.05
Hastalık Kontrol / Kurkumin	0.0488*	P<0.05

Resveratrol, fingolimod ve kurkumin sonuçları istatistikî olarak anlamlı iken, suramin ve NAC sonuçları istatistikî anlamlı değildir. (NAC: N-Asetil Sistein)

Şekil 3.21 İncelendiğinde otizm ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan CC2D1A geni mRNA ekspresyonu (Dana vd., 2020, Mossa ve Manzini, 2021; Manzini vd., 2014; Oaks vd., 2017; Ozkul vd., 2020; Sener v.d., 2016; Sener vd., 2020; Zamarbide vd., 2018; Zamarbide vd., 2019) önlenmesinde fingolimodun en etkili olduğu onu sırası ile kurkumin ve resveratrolün izlediği görülmektedir.

CC2D1A Gen ekspresyonu açısından Hastalık Grubu ile, Kontrol Grubunu birbirleri ile karşılaştırdığımızda, Hastalık Grubunda, CC2D1A gen ekspresyon düzeyinin, Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. ($p=0.0190, P < 0.05$). Bu durum ilgili gen ekspresyonunun, otizm ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda Casp3 Genine ait mRNA ekspresyonu ve tedavi için kullanılan maddelerin ilgili gen ekspresyonu üzerine etkileri de CC2D1A genine ilaveten araştırılmış olup maalesef Casp3 Gen ekspresyon sonuçları denenmiş olan bütün örnekler için RT-PCR CT değerleri belirlenememiştir (undetermined). Bu nedene de CASP3 gen ekspresyon ile ilgili olarak Hastalık Kontrol grubu ile bütün Tedavi Grupları arasında ayrı ayrı ve karşılaştırmalı sonuçlar verilememiştir.

3.4. Histopatolojik İnceleme Bulguları

Her tablodan önce ilk sphericity testine bakılıp çıkan değer anlamlılık durumuna göre Sphericity Assumed Greenhouse-Geisser

Huynh-Feldt üç farklı değerden bakılacak olana karar verilmiştir. Bu nedenle üç farklı değer görülmektedir, ve ona göre yorumlanmıştır.

A1 Hastalık (Tedavi Kontrol) Grubu

B1 Suramin Tedavi Grubu

C1 Kurkumin Tedavi Grubu

D1 Resveratrol Tedavi Grubu

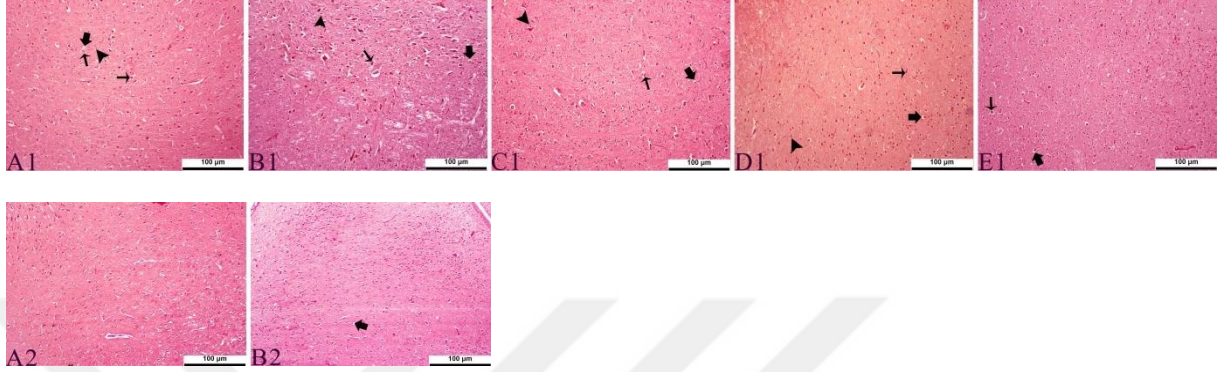
E1 N-Asetil Sistein Tedavi Grubu

B2 Fingolimod Tedavi Grubu

A1,B1,C1,D1,E1: KALIN OK: Nöronlar vakuolizasyon oluşumları

İNCE OK: Kramatolizis

OK BAŞI: Fokal glia hücre infiltrasyonu ve nöronofaji alanı



Şekil 3.22: İlaç Uygulamasının Ratların Birinci Ay (A1, B1, C1, D1, E1) ve İkinci Aya (A2, B2) Ait Beyin Dokularında Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler.

Tüm şekiller H&E ile boyanmıştır. Orijinal büyütme oranı olarak 10x ve 100 µm kullanılmıştır. Beyin dokusunda nöronofaji ve fokal glia hücre infiltrasyonu oluşumları (ok başı), nöronlarda vakuolizasyon oluşumları (kalın ok), kramtolizis (ok başı).

(Şekil 1-A1, B1, C1, D1, E1);

(A1) Hastalık (Tedavi) Kontrol Grubu, (B1) Suramin Tedavi Grubu, (C1) Kurkumin Tedavi Grubu, (D1) Resveratrol Tedavi Grubu, (E1) N-Asetil Sistein Tedavi Grubu, (A2) Kontrol Grubu, (B2) Fingolimod Tedavi Grubu.

(1)'ler birinci ay, (2)'ler ise ikinci aya ait histopatolojik görünümleri göstermektedir.

A: Kontrol Grubu

B: Hastalık (Tedavi) Kontrol Grubu

C: Suramin Tedavi Grubu

D: Kurkumin Tedavi Grubu

E: Resveratrol Tedavi Grubu

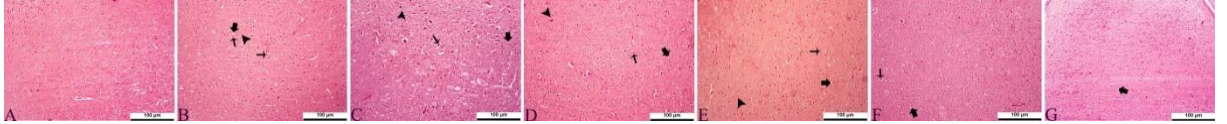
F: N-Asetil Sistein Tedavi Grubu

G: Fingolimod Tedavi Grubu

B,C,D,E,F,G: KALIN OK: Nöronlar vakuolizasyon oluşumları

B,C,D,E,F: İNCE OK: Kramatolizis

B,C,D,E : OK BAŞI: Fokal glia hücre infiltrasyonu ve nöronofaji alanı



Şekil 3.23:İlaç Uygulamasının Ratların (A, B, C, D, E, F, G) Beyin Dokularında Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler.

Tüm şekiller H&E ile boyanmıştır. Orijinal büyütme oranı olarak 10x ve 100 µm kullanılmıştır. Beyin dokusunda nöronofaji ve fokal glia hücre infiltrasyonu oluşumları (ok başı), nöronlarda vakuolizasyon oluşumları (kalın ok), kramtolizis (ok başı).

(Şekil 1-B, C, D, E, F, G); (A) Kontrol Grubu, (B) Hastalık (Tedavi)Kontrol Grubu, (C) Suramin Tedavi Grubu (D) Kurkumin Tedavi Grubu (E) Resveratrol Tedavi Grubu (F) N-Asetil Sistein Tedavi Grubu (G) Fingolimod Tedavi Grubu.

Çizelge 3.9: Bütün Çalışma Gruplarına Göre Elde Edilen Histopatolojik Bulgular

Organ	HistoPatoloji k Bulgular	Kontrol Grubu	Hastalık Grubu	Suramin	Kurkumin	Resveratrol	N-Asetil Sistein	Fingolimod	"p" değerleri
Beyin Dokusu	Kramatolizis	0,00±0,0 0 ^c	1,77±0,8 2 ^a	1,06±0,9 3 ^{ab}	0,90±0,79 ^{ab} c	0,53±0,88 ^{bc}	0,36±0,56 ^{bc}	0,18±0,44 ^{bc}	0,002
	Fokal glia hücre infiltrasyonu ve nöronofaji alanı	0,00±0,0 0 ^d	2,10±0,6 3 ^a	1,76±1,0 3 ^a	1,60±0,88 ^{ab}	0,90±0,79 ^{bc}	0,73±0,056 ^c d	0,18±0,44 ^{cd}	0,000
	Nöronlar vakuolizasyon oluşumları	0,00±0,0 0 ^c	1,95±0,7 8 ^a	1,93±0,4 0 ^a	1,08±0,66 ^b	0,90±0,79 ^b	0,73±0,56 ^{bc}	0,55±0,60 ^{bc}	0,000

Hastalık grubunda beyinde kapillar damarlar hiperemik olup, kanama alanları gözlemlendi Perivasküler dilatasyon belirgin olduğu görülmüştür. Nöron dejenerasyonu ile birlikte nöronofaji, kramatolizis ve nöronlarda vakuolizasyon oluşumları dikkati çekmiştir. Suramin tedavigrubunda beyinde olguların tamamında kortekste kapillar

damarlar hiperemikti. Parankimde, bazı nöronlarda nöron dejenerasyonu ile birlikte nöronofaji, kramatolizis ve nöronlarda vakuolizasyon oluşumları gözlenmiştir. Kurkumin tedavigrubunda beyinde kapillar damarlar genellikle hiperemikti. Bazı nöronlarda vakuolizasyon ve perinöral dilatasyonla birlikte nöronofaji görülmüştür. Resveratrol tedavi grubunda grubunda beyinde bazı nöronlarda birkaç adet mikrogliadan oluşan fokal mikrogliya reaksiyonuna rastlanmıştır. N-Asetil sistein tedavi grubunda beyinde kortekste bazı olgularda, kapillar damarlar hafif şiddette hiperemikti. Parankimde, bazı nöronlarda perinöral dilatasyonla birlikte dejeneratif değişiklikler ve nöronofaji gözlenmiştir. Fingolimod tedavi grubunda grubunda beyinde az sayıda vakuolizasyon oluşumları görülmüştür.



4. TARTIŞMA

OSB kronik ve yaygın nörogelişimsel bozukluktur Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) çocuklarda 1:45 oranında görülmektedir (Zablotsky vd., 2015). Konuşma becerilerinde, insanlar ile iletişim becerilerinde, yetersizlik ile birlikte, tekrar hareketleri, yalnız yaşama eğilmi, motor fonksiyonlarda yetersizlik ve göz teması zayıflığı veya kaçınma...vs gibi nöro-davranışsal şartlar ile ilgili kompleks bulgular ile kendini göstermektedir (Sunand vd., 2020). Otizm ekrek çocuklarında kız çocuklara göre 4-5 kat daha fazla görülmektedir. Otizmin muhtemel nedenleri genetik, çevresel faktörler, maternal toksisite ve beslenme ile ilgili yetersizliklerdir (Bromly vd., 2013, Baio vd., 2018; Gonzales vd., 2016; Sunand vd., 2020).

Otizm gibi nörogelişimsel hastalıklar ile ilgili hayvan model çalışmaları önemli ve gerekli araştırma alanıdır. Bu çalışmalar kullanacağınız modele ve çalışma planlaması (dizaynı) na göre hastalığın etiyo-patogenezi ile birlikte otizmde görülen bozuklukların iyileştirilmesinde birtakım maddelerin faydalı ve etkin olup olmadıklarının ortaya konulması açısından da kıymetli ve prediktif (öngörüle bulunan) değere sahip sonuçlar verebilmektedirler (Nithianantharajah vd., 2017).

VAP ile indüklenerek oluşturulmuş otizm modelleme çalışmaları aslında kıymetli bir araştırma metodudur ki araştırmalar ile başlıca; otizmin nörobiyolojik seyri, otizmde görülen davranış bozuklukları, ve otizmde görülen davranış bozukluklarının ve sosyal becerilerde görülen yetersizliklerin iyileştirilmesi ve azaltılmasına katkıda bulunarak faydalı olabilecek tedavi edici yeni birtakım maddelerin keşfedilmesi ve sonuçlarının izlenerek belirlenmesi konularında çok faydalı bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir (Schneider vePrzewlocki, 2005; Sunand vd., 2020; Wu vd., 2017; Wu vd., 2018).

Prenatal valproik asite dişi sıçanların (rat) veya farelerin (mice, murine), maruz kalması ile yeni doğan yavru (offspring, pup) sıçanlarda/farelerde otizm benzeri davranış bozuklukları, bağırsakta, beyinde enflamasyon, mikrobiyota kompozisyon değişiklikleri, proniflamatuvar sitokin aktivasyonu, epigenetik ve gen ekspresyonregülasyonları üzerinde çeşitli etkiler, ve enflamasyon ve oksidatif stres yolak aktivasyonu görüldüğü, ve antikonvulsan ajan olan VPA'ya perinatal

maruziyetin OSB için bir risk faktörü olduğu çeşitli hayvan modelleme çalışmalarında bildirilmiştir (Arafat ve Shabaan, 2019; Argyropoulos vd., 2013; Al-Askar vd., 2017; de Theije vd., 2014; Gonzales vd., 2016; Kazlauskas vd., 2014; Lucchina ve Depino, 2014; Liu vd., 2018; Sunand vd., 2020; Ruhela vd., 2019; Wu vd., 2017; Wu vd., 2018; Wu vd., 2017; Zhang vd., 2017; Zhou vd., 2016).

Otizm deney hayvan modellemelerinde sadece perinatal VPA verilmek sureti ile yapılan çalışmalarda değil aynı zamanda farklı modellemeler ile örneğin otistik çocuklardan elde edilen fekal örneklerin fekal mikrobiyota transferi protokolüne uygun olarak yapılan ön hazırlık işlemleri sonucunda elde edilen mikrobiyota süspansiyonunun dişi steril farelere (germ free mice) oral gaa ile aktarılmasından 21 gün sonra gebe kalamalarını takiben doğan bebek farelerin hepsinde otizmde görülen davranış bozukluklarının olduğu, buna karşık çalışmada sağlıklı kontrol olarak oluşturulan otizm ve nöro-psikiyatrik, metabolik, oto-immün..vs hastalıkları olmayan tamamen sağlıklı kontrol grubu çocuklardan elde edilen fekal örneklerin aynı metotları ile işlenmesi ile elde edilen fekal mikrobiyota örneklerinin aynı şekilde transferi sonucunda doğan bebek farelerin hiçbirisinde otizmde görülen davranış bozukluklarına rastlanılmamış olduğu bildirilmiştir. Bu tür çalışmalar göstermektedir ki; perinatal dönemde biyolojik homeostazisi bozmaya yönelik olan bazı maddelere ve dğişikliklere annenin maruz kalması, in-utero dönemde fetal organogenesis ve bilhassa nörogeneziste beyin dokusunda ve nöronal hücrelerin sayı ve fonksiyon olarak diferansiyasyonu ve maturasyonu aşamalarında birtakım bozukluklara yol açmak sureti ile doğan bebeklerde davranış bozukluklarının görülmesine sebebiyet vermektedir. (Sharon vd., 2019).

Yaptığımız çalışmada prenatal VPA'ya maruz kalan dişi sıçanlardan doğan doğan bebek sıçanların kognitif (bilişsel) fonksiyonlarını değerlendirmeye yönelik olarak yapmış olduğumuz water maze davranış testinde hastalık grubu ile kontrol grubu birbirleri ile karşılaştırıldığında hastalık grubunda otizm bulguları lehine bozukluk meydana geldiği ve istatistiki olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. ($p < 0.05$) (Çizelge 3.6).

Çalışmamızda elde ettiğimiz davranış test bulguları, benzer modelleme ile önceden yapılmış olan çeşitli ve benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumlu ve birbirini destekler mahiyette olduğu anlaşılmaktadır.

Sıçanlar ile prenatal VPA verilmesi sureti ile yapılan çeşitli hayvan deneyi çalışmalarında da aynı şekilde; doğan bebek sıçanların water maze test sonuçlarına dayanılarak kognitif becerilerde hastalık grubunda otizm lehine bozulmalar olduğu ve kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda istatistiki anlamlı farklar bulunduğu bildirilmiştir (Al-Askar vd., 2017; Arafat ve Shabaan, 2019; Liu vd., 2018; Sunand vd., 2020; Wu vd., 2017; Wuhela vd., 2019; Zhou vd., 2016; Zhang vd., 2017).

Çalışmamızda beyin dokusundan yapılan histopatolojik mikroskopik incelemelerde, hastalık grubunda beyinde kapillar damarlar hiperemik olup, kanama alanları gözlendi perivasküler dilatasyon belirgin olduğu görülmüştür. Nöron dejenerasyonu ile birlikte nöronofaji, kramatolizis ve nöronlarda vakuolizasyon oluşumları varlığı belirlenmiştir.

Beyin dokusunun histopatolojik incelemeleri ile elde edilen bulgular açısından hastalık grubu ile kontrol grubu birbirleri ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda; nöronal dokuda kramatolizis($p= 0,002$), fokal glial hücre infiltrasyonu ve nöronofaji alanı ($p=0,000$) ve nöronlarda vakuolizasyon oluşumlar ($p=0,000$) varlığı belirlenmiştir. Hasta grubunda görülen patolojik değişiklikler, kontrol grubuna göre istatistiki olarak karşılaştırıldığında her üç bulgunun da istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p<0.005$), histoptolojik bulguların onarılmasında fingolimodun en etkin madde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.9).

Yukarıda açıklanan beyin dokularına ait histopatolojik bulgular, perinatal dönemde VPA'ya maruz kalmanın, doğan bebek farelerin beyin ve nöronal dokularında otizm lehine görülen patolojik bulgular ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Otizmli insanlarda ve hayvan modelleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda; OSB patolojisinde çevresel faktörlerin önemini vurgulayan önemli şu bulgulara rastlanmıştır; nöroenflamasyon, mikrogliaaaktivasyonu anormal sitokin sinyalizasyonu, peirferal immün sistem ile ilgili anormallikler (doğal ve kazanılmış

immün yolakların her ikisinde) (Bjorklund vd., 2016; De Jones vd., 2017; Estes ve McAllister, 2016; Simon vd., 2020; Suzuki vd., 2013).

Çalışmamızda elde ettiğimiz beyin dokusuna ait histopatolojik inceleme bulguları, yukarıda açıklanan çalışmalardan elde edilen bulgular ile örtüşmektedir, ve birbirlerini teyit etmektedirler.

Di Stasi vd. (2019) tarafından yayımlanan, otizmlili nisanlara ait postmortem beyin dokularından yaptıkları otopsi çalışmasında, beyin dokusundan histopatolojik ve immünohistokimya metodları ile inceleme yapmışlardır ve başlıca şu bulguları belirlemişlerdir; beynin birçok bölgesinde beyaz ve gri cevherde ve leptomeninkslerde, multifokal içinde artmış sayıda lenfosit içeren perivasküler lenfositik birikimler, CD20+'ye göre predominant olmak üzere CD3+, ve CD8+'e göre predominant olmak üzere CD4+ sayılarında artışlar ve yuvarlak membranöz blebler ve perivasküler bölgelerde multifokal hasarlar olduğu ve astrogliosis (mikroglia ve astrosit aktivasyonu) varlığı belirlenmiştir.

Otizimde beyinde meydana gelen histopatolojik değişiklikleri gösterebilmeyi amaçlayan deneysel hayvan otizm modelleme çalışmalarında beyinde başlıca nöroinflamasyon, myelitis, dejenerasyon, nöronofaji, kramatolizis ve nöronlarda vakuolizasyon oluşumlarının varlıklarına ilaveten gliosis tablosu ile mikroglia ve astrosit hücrelerinde aktivasyonların varlıkları gösterilmiştir (MacFabe vd., 2011; MacFabe vd., 2007; Matta vd., 2019; Meeking vd., 2020; Ruhela vd., 2019; Sharon vd., 2016; Sharon vd., 2019, Shultz vd., 2008; Shultz vd., 2009).

Çeşitli çalışmalara ait otizm deney hayvan modellemelerinden elde edilen beyin dokularının histopatolojik inceleme bulgularının, çalışmamızdan elde ettiğimiz hasta grubunun oluşturan bebek sıçanların beyin dokularına ait histopatolojik bulgular ile uyumlu olduğu ve birbirlerini desteklediği anlaşılmaktadır.

Fingolimod Sfingozin 1 fosfat (S1P) analogudur. Sfingozin 1 fosfat (S1P) beyin gelişiminde önemli bir rolü olan plazma-membran sfingolitlerinin aktif bir metabolitidir, ve S1P'nin yolaklarında meydana gelebilecek değişiklikler ise bazı nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Anderson ve Maes, 2014; De Simone vd., 2020; Mühle vd., 2013 van Echten-Deckert vd.,

2014). Son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda hem OSB'li hastalarda hem de otizm hayvan modellemelerinde S1P düzeyinde artış olduğu belirlenmiş olup, bu gerçeğin açığa çıkması otizmin tedavisinde S1P yolaklarının potansiyel bir terapötik hedef olabileceği fikrine işaret etmektedir. (De Simone vd., 2020; Wang vd., 2016; Wu vd., 2017; Wu vd., 2018). Bu işaret deney hayvanları ile VPA ile otizm modelleme çalışmaları ve nörogelişimsel bir hastalık olan Rett sendromu için modellenmiş Mecp2 fareler (knock out mice; transgenic fare; herhangi bir hastalık için önceden modellenmiş hazır fareler) hastalığın iyileştirilmesi ve faydalı etkilerinin gözlemlenmesi için S1P reseptör ligandı olan FTY720'nin verildiği çalışmalar ile desteklenmiştir (Deogracias vd., 2012; De Simone vd., 2020; Wu vd., 2017, Wu vd., 2018).

Suraminin otizm üzerine etkisi başlıca hücre tehlike cevabı (CDR, cell danger response) üzerinden olmaktadır ve çeşitli metabolomik çalışmalar hücre tehlike cevabı ve pürinerjik sinyalizasyonun önemini göstermiştir (Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014; Naviaux,2014; Naviaux vd., 2015, Naviaux vd., 2017). Suramin, deney hayvanı modellerinde ve otizmlı çocuklarda, merkezi sinir sistemini hedef alan (MSS, CNS, central nervous system) etkileri olduğu gösterilmiştir (Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014; Naviaux, 2014; Naviaux vd., 2015, Naviaux vd., 2017). Süraminin doğal immünite, metabolizma, ağrı, bağırsak, otonomik, enflamatuvar, ve prünerjik sinyalizasyon ile düzenlenen diğer yollar üzerine etkileri vardır ki bütün bunlar süramin ile ilgili gözlemlenen faydalı etkilere katkıda bulunabilir (Burnstock, 2014; Burnstock, 2006; Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014; Naviaux, 2014; Naviaux vd., 2015, Naviaux vd., 2017;).

Naviaux vd. (2017) Tarafından insanlarda otizm tedavisinde düşük doz suramin küçük randomize klinik deneme FazI/II çalışması 10 adet otizmlı 5-14 yaş arası çocuklarda denenmiş ve dil ile sosyal becerilerde gelişme ile birlikte sınırlanmış ve tekrar hareketlerinde de azalma olduğu bildirilmiştir. Ancak literatür incelendiğinde bu çalışmanı daha çok sayıda örnekler ile desteklenmediği ve çalışmanın ilerlemediği görüldüğü gibi insanlarda başka çalışmalar ile de desteklenmediği görülmektedir

Çalışmamızda kullanılan N- Asetil sistein (NAC); antioksidan olarak uzun yıllar bilinen ve yaygın olarak kullanılmış olan bir ilaçtır ve yapılmış çeşitli

alışmalar otizimli hastaların zllikle steriotipik ardışı tekrar hareketlerinin alternatif tedavi stratejisinde bir potansiyle sahip olabileceği önerilmiştir (Al-Dbass, 2014, Farr vd., 2003; Zhang vd., 2017).

Daha önce yapılmış çeşitli çalışmalar otizmin gelişminde oksidatif stresin rol oynayabileceği bildirilmiştir (Ghanizadeh vd., 2012; Ghezzeo vd., 2013; Zhang vd., 2017). N- Asetil sistein, L-sistein aminoasidi kaynağıdır ve MSS'deki (CNS) hücre içi antioksidan olan glutatyonun (GSH) meydana gelmesi için öncül molekülüdür ve bunlara ilaveten serbest oksijen radikallerinidirekt olarak temizlemek sureti ile MSS'de nöronları koruyucu olarak da işlev görmektedir (Al-Dbass vd., 2014; Dean vd., 2011; Farr vd., 2003; Ghanizadeh ve Derakhshan, 2012; Wang vd., 2007; Zhang vd., 2017).

NAC kan beyin bariyerini (BBB, Blood-brain barrier) geçebilir, oksidatif stres, enflamatuvar sitokin üretimini, ve glutatyonun (GSH) yeniden ilkmalini azaltıcı etki göstermek sureti ile otizm ile ilişkili olarak yorumlanan kendine zarar verme davranışını da içine alan otizm ile ilişkili irritabiliteyi azaltıcı etkisi olabileceği bildirilmiştir (Farr vd., 2003; Holmay vd., 2013; Hardan vd., 2012; Paintlia vd., 2004Zhang vd., 2017).

Kurkumin ile ilgili yapılmış olan çeşitli deneysel çalışmalarda kurkuminin; güçlü anti-enflamatuvar, antioksidan ve antineoplastik etkisi olduğu onaylanmış olmakla birlikte, nörolojik ve psikiyatrik bozuklukluklarda nöron koruyucu, nörogenezi artırıcı, nroenflamasyonu azaltıcı, mitekondriyal fonksiyon bozukluklarını azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Aggarwal ve Harikumar, 2009; Al-Askar vd., 2017; Biswas vd., 2019; Bhandari ve Kuhad, 2015; Bhat vd., 2019; Di Meo vd., 2019, Gan vd., 2019; Mohammadian Haftcheshmen vd., 2020; Poullose vd., 2017; Shrishail vd., 2013; Wilson ve Maulik, 2018, Zhong vd., 2020).

Çeşitli deney hayvanı modelleme çalışmalarında, örneğin sıçanlar ile yapılmış olan Alzheimer Hastalığı (AD) modelinde kurkuminin tedavisininkognitif hasarlanmadan anlamlı seviyede kurtardığı, hipokampal nrogenesisi artırdığı gösterilmiştir (Tiwari vd., 2019; Zhong vd., 2020).

Dong vd, (2019) tarafından yaşlı sıçanlarda, yaşlılığa bağlı nöronal fonksiyon kaybının araştırdıkları bir çalışmada, kurkuminin nöronal gelişim ve sinaptik plastisite üzerine olan muhtemel etkisinden kaynaklı olarak biliş, idrak ve hipokampal nörojenezi artırdığı bildirilmiştir (Dong vd., 2012; Zhong vd., 2020).

Al-Askar vd. (2017) tarafından sıçanlarda VPA ile indüklenmiş otizm modellemesi çalışmasında postnatal kurkumin destek tedavisinin verilmesi ile nöronal maturasyon gecikmesinde olumlu gelişmeye neden olduğu ve beyin toksisitesini de azalttığını bildirmişlerdir.

Bhandari ve Kuhad (2015) tarafından gerçekleştirilmiş başka bir hayvan deneyli otizm modelleme çalışmasında ise, kurkumin nöronkoruyucu etkisine bağlı olarak tipik otizm bulgularında geri dönüş olduğu, ve TNF- α ve Matrix metallo proteinase-9'a (MMP-9) karşı antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Her ne kadar kurkuminin nöroenez üzerine artırıcı etkisinin altında yatan mekanizma tam olarak açıklanamamış olsa da; bu çalışmaların otizm ile ilişkili bulguların tedavisinde kurkuminin terapotikpotansiyele sahip olduğu konusunda birbirleri ile korelasyon gösterdiklerini ortaya koymuştur (Al-Askar vd., 2017; Bhandari ve Kuhad, 2015; Biswas vd., 2019; Bhat vd., 2019; Di Meo vd., 2019; Gan vd., 2019; Mohammadian Haftcheshmen vd., 2020; Poulouse vd., 2017; Shrishail vd., 2013; Wilson ve Maulik, 2018; Zhong vd., 2020).

Resveratrolun gerek davranış bozukluklarının iyileştirilmesi üzerin olumlu etkilerini, gerekse de antioksidan ve antienflamatuvar iyileştirici etkilerini incelemek ve göstermek amaçları ile son yıllarda yapılmış olan deneysel otizm modellemesi çalışmaları incelediğimiz zaman çoğunluğunun sıçanlar ile ve prenatal VPA'ya maruz bırakılma modeli ile, çok az sayıdaki bir iki çalışmanın ise lateral ventrikül içine (ICV, intra cerebro ventricula) propiyonik asitin (PPA) tek doz enjeksiyon uygulaması ile yapılmış olduğu ve bu çalışmalarda RSV'un sosyal becerilerin gerilemesi steriotipik hareketler, hiperaktivite, anksiyete, ve kognitif fonksiyonların bozulmasında azaltıcı ve iyileştirici etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Arafat ve Shaban, 2019; Bambini-Junior vd., 2014; Bhandari ve Kuhad, 2017; Fontes-Dutra vd., 2018; Malaguenera vd., 2020).

Çalışmamızda Hastalık Grubu ile Kontrol Grubuna ait davranış test (Water Maze Testi) sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.6). Bu sonuç VPA ile ündüklenmiş otizm modellemesinin başarılı olduğunu ve perinatal VPA verilen anne sıçanlardan doğan bebek sıçanların otizm benzeri davranış bozuklukları gösterdikleri, sıçanların kognitif fonksiyonlarında bozulmalar olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz davranış testi sonuçlarını benzer çalışmalardan elde edilen davranış testi sonuçları ile karşılaştırdığımızda ise; VPA ile indüklemeye ile otizm modellemesi yapılmış olan pek çok çalışmada, Water Maze davranış test sonuçları incelendiğinde, hastalık grubuna ait kognitif fonksiyonlarında, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olarak, otizm benzeri bozukluklar belirlendiği bildirilmiştir (Al-Askar vd., 2017; Arafat ve Shabaan, 2019; Bambini-Junior vd., 2014; Bakheet vd., 2016; Bhandari ve Kuhad, 2017; De Simone vd., 2020; Fontes-Dutra vd., 2018; Farr vd., 2003; Hirsch vd., 2018; Liu vd., 2018; Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014; Sunand vd., 2020; Wu vd., 2017; Wu vd., 2018; Wuhela vd., 2019; Xie vd., 2018; Zhang vd., 2017; Zhong vd., 2020; Zhou vd., 2016).

Çalışmamızda tedavi edici olarak kullanılan beş etken maddelerin davranış testleri ile ilgili sonuçlarını inceleyerek karşılaştırdığımızda; Suramin (Çizelge 3.1), fingolimod (Çizelge 3.4), kurkumin (Çizelge 3.3), ve resveratrol (Çizelge 3.5) ile hastalık kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuş iken ($p<0,05$); N-asetil sistein (Çizelge 3.2) ile hastalık kontrol grubu arasında istatistiki anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Otizmde görülen kognitif bozukluklar için iyileştirici etkilerinin olup olmadığı incelenmiş olan ve iyileştirici olup olmadığı çalışmamızda denenmiş olan beş etken maddelere ait elde ettiğimiz davranış test sonuçlarını aynı etken maddelerin kullanıldığı deney hayvanı otizm modellemesi uygulanmış önceden yapılmış diğer çalışmalarından elde edilen davranış test sonuçları ile karşılaştırdığımızda, çalışmamızda incelediğimiz dört etken maddelerin (suramin, fingolimod, kurkumin, ve resveratrol) kognitif fonksiyonlar üzerine olumlu iyileştirici etkiye neden olduğu belirlenmiş olup, bu sonuçların aynı modelleme ile aynı etken maddelere ile yapılmış

aşağıdak bildirilmiş olan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçları le uyumlu olduğu, ve bütün çalışmalardan elde edilen sonuçların, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları desteklediği belirlenmiştir;suramin (Naviaux vd., 2013; Naviaux vd., 2014), fingolimod(De Simone vd., 2020; Wu vd., 2017; Wu vd, 2018), kurkumin(Al-Askar vd., 2017; Zhong vd., 2020), ve resveratrol (Bambini-Junior vd., 2014; Bakheet vd., 2016; Bhandari ve Kuhad, 2017; Fontes-Dutra vd., 2018; Hirsch vd., 2018; Xie vd., 2018).

Çalışmamızda, N- asetil sistein uygulaması sonrası kognitif fonksiyonlarda iyileştirici etkiye rastlanmamış olup, bu sonuç daah önceden yapılmış çok az sayıdaki benzer modelleme çalışmalarından elde edilen sonuçlardan farklıdır (Farr vd., 2003; Zhang vd., 2017).İlgili literatürleri dikkat ile inceledğimizde,bu farklılığın sebebi olarak şu nokta dikkatimiz çekmiştir; ilgili literatürler N-asetil sistein uygulamasının otizm modellemesi yapılmış deney hayvanlarında kognitif fonksiyonlarda görülen bozuklukların iyileştirilmesinden daha çok, otizmde görülen temel davranış bozukluklarından birisi olan tekrarlayıcı/steriotipik davranışlar üzerine iyileştirici özelliği vurgulanmıştır ve Zhang vd. (2017) tarafından yapılmış çalışmada bu özellik makalenin başlığına taşınmıştır (N-acetylcystein ameliorates repetitive/steriotypic behaviour due to its antioxidant properties...).

Çalışmamamızda beyin dokusundaki miktarlarını ELISA yöntemi ile ölçtüğümüz altı adet test parametreleri (IL-1 β , IL-6, TNF- α , GPX, MDA, ve CASP3) ile ilgili olarak tedavi edici olarak kullanılmış olan beş etken maddelere ait Tedavi Gruplarından elde edilen sonuçları, Hastalık Kontrol Grubundan elde edilen sonuçlar ile tek tek karşılaştırdığımızda; fingolimod tedavi grubuna ait GPX ve CASP3 testlerde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Çizelge- 3.7). Hastalık Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında, Fingolimod verilmesinin GPX ve CASP3 ekspresyonlarını ve dolayısı beyin dokusunda her iki molekülün ölçülebilen seviyelerinde belirgin azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Apoptotik yolak aktivasyonunu göstergesi olan kaspaz3 (CASP3) ile, oksidatif stres yolak aktivasyonunun belirgin göstergelerinden olan gultayon peroksidaza (GPX) ait doku seviyelerinin azalması fingolimodun her iki yolağın (apoptozis ve oksidatif stres) baskılanmasında etkin olduğunu göstermektedir.

Fingolimodun, CASP3 üzerine anlamlı düzeyde etkisi muhtemelen fingolimodun immünomodulator etkisinden kaynaklanmıştır. Fingolimodun GPX üzerine olan etkisi ise, muhtemelen fingolimodun oksidatif stres yolları üzerine nisbeten daha güçlü olan antioksidan etkisinden kaynaklanmıştır.

Çalışmamızda diğer dört adet testlerin (IL-1 β , IL-6, TNF- α ve MDA) beyin doku seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmesi ile elde etmiş olduğumuz Hastalık Kontrol Grubuna ait sonuçlarla, diğer dört etken maddelerin kullanıldığı dört farklı Tedavi Gruplarından (Suramin, Resvareatrol, Kurkumin, ve N-Asetil sistein) elde edilen sonuçları, her bir test parametresi ve her bir grup için ayrı ayrı ve tek tek birbirleri ile karşılaştırıldığında hiçbirisinde istatistiki anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge- 3.7).

Çalışmamızdan elde edilen, ELISA testlerine ait sonuçları benzer çalışmalardan elde edilen ELISA testlerine ait sonuçlarla karşılaştırdığımızda şu noktaları belirleyebiliriz; öncelikle her çalışmada, ölçümlerin yaptığımız aynı test parametrelerinin çalışmadığını, bazı çalışmalarda birkaç test ile sınırlı olmak üzere benzer tetlerin çalışıldığını, ancak bu çalışmaların çoğunluğunda ise beyin dokusundan yapılan ölçümlerde ELISA yönteminin kullanılmadığını, özellikle deney hayvanlarına ait beyin dokusundan yapılan ölçümler için analitik hassasiyeti ELISA ile karşılaştırıldığında ELISA yönteminde çok daha kesin ve düşük değerlerin dahi mükemmel olarak ölçebilen ancak maliyet açısından ELISA yöntemine göre çok çok daha pahalı olan Western Blott yöntemi kullanıldığı görülmüştür.

Çalışmamızda fingolimod tedavi grubuna ait GPX testi için elde ettiğimiz sonuçların, Wu vd. (2017), tarafından VPA indüksiyonu ve sıçanları ile yapılmış deney hayvanı otizm modelleme çalışmasından elde ettikleri sonuçları ile uyumlu olduğu, ve Wu vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada CASP3 testinin çalışmadığı belirlenmiştir.

Otizm etiyolojisinde epigenetik ve genetik faktörlerin rol oynayabileceği konusunda bu güne kadar pek çok farklı genler hakkında çeşitli çalışmalar yapılmış ve belirli genlerin ekspresyonlarının (*Cc2d1a*, *Caspr2*, *Pgrn*, *Gapd*), hipoekspresyonlarının (*Shank3*) veya belirli genlerde (*MeCP2*, *PTEN*, *Shank1*,

Ncor1, Cdkl5) görülen mutasyonların ve bu mutasyonların sonucunda meydana gelebilen gen regülasyon bozukluklarının otizm etiyolojisi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Almeida vd., 2014; Duffney vd., 2015; Lyu vd., 2016; Ozkul vd., 2020; Sener vd., 2020; Sener vd., 2016; Waye vd., 2018, Wang vd., 2016, Zamarbide vd., 2018; Zhang vd., 2012; Zhou vd., 2016;).

Çalışmamızda ekspresyonunu araştırdığımız *CC2D1A* geni, çift kıvrımlı ve C2 domain içeren protein 1A geni olup; bir serotonin reseptör 1A (HTR1A) ekspresyon baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Basel-Vanagiate vd., 2016).

CC2D1A Gen ekspresyonu açısından Hastalık Grubu ile, Kontrol Grubunu birbirleri ile karşılaştırdığımızda, Hastalık Grubunda, *CC2D1A* gen ekspresyon düzeyinin, Kontrol Grubuna göre istatistiki anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu durum ilgili gen ekspresyonunun, otizm ile ilişkili olduğunu göstermektedir. *CC2D1A* Geni otizm ile ilişkisinin, *CC2D1A* Geninin NF- κ B promotor aktivatörü olması ve bunun da hafıza ve nöral plastisite ile direkt ilişkili olmasından, *CC2D1A* geninin bir serotonin reseptör 1A (HTR1A) ekspresyon baskılayıcısı olması ve serotoninin ise sinaptogeneze ve nöral migrasyonda önemli rol oynamasından ve serotonin reseptörleri seviyesinin nihai olarak normal ve patolojik beyin gelişimi ile ve nöronal transmisyonun etkisinde azalma ile ilişkili olmasından kaynaklanabilir (Basel-Vanagiate vd., 2007; Carr ve Lucki., 2011; David vd., 2005; Jacobs ve Azmitia, 1992; Oblak vd., 2013; Ozkul vd., 2020; Sener vd., 2016; Rogaeva vd., 2007)

Çalışmamızda beyin dokusu serotonin seviyesini incelememiş olmakla birlikte *CC2D1A* geninin otizm ile ilişkisi nöronları ve dolayısı ile beyin gelişimi ve fonksiyonlarını etkileyen yukarıda açıklanmış olan mekanizmalar ve doğurduğu patolojik sonuçları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda tedavi edici olarak kullanılan beş etken maddelerin *CC2D1A* geni mRNA ekspresyonu ile ilgili sonuçlarını, Hastalık Kontrol grubu ile tek tek karşılaştırdığımızda; otizm ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan *CC2D1A* geni mRNA ekspresyonu önlenmesinde fengolimodun ($p < 0,05$) en etkili olduğu onu sırası ile kurkumin ($p < 0,05$) ve resveratrolün ($p < 0,05$) izlediği, ve

suramin ve N-asetil sisteine ait etki sonuçlarının ise istatistiki olarak anlamlı olmadığı görülmektedir(Şekil 3.2, Çizelge 3.8) (Dana vd., 2020;Manzini vd., 2014; Mossa ve Manzini, 2021; Oaks vd., 2017; Ozkul vd., 2020; Sener v.d., 2016; Sener vd., 2020;Zamarbide vd., 2018; Zamarbide vd., 2019).

İncelediğimiz literatürlerde CC2D1A Gen ekspresyonu ile otizmde görülen davranış bozukluklarının iyileştirilmesine yönelik iyileştirici madde veya maddelerin birlikte çalışıldığı deney hayvanı otizm modelleme çalışması bulunamamıştır. Bu açıdan bu çalışma yaptığımız literatür taraması sonucunda dünyada ilk olma özelliği taşıması noktasından hareketle çalışmanın özgün değerinin yüksek olduğu söylenebilir. Bu nedenle de gen ekspresyonu-etken maddeler ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar başka çalışmalar ile tartışlamamıştır.

Otizm deney hayvan modellemesinde, CC2D1A Gen ekspresyonu ile birlikte, bu çalışmada kullandığımız maddelerin birlikte incelendiği benzeri bir çalışmaya rastlayamadığımız için, CC2D1A gen ekspresyonu üzerine baskılayıcı etkili olduklarını belirlediğimiz fingolimod, kurkumin ve resveratrolun etki mekanizmaları hakkında kesin bir literatür bilgisine ulaşamamıştır. Ancak üç etken maddelerin etki mekanizmalarını dikkate aldığımızda; CC2D1A geni ekspresyonu üzerin olan belirlenen etkilerinin muhtemelen her üç maddeye ait nöron koruyucu (neuroprotective) etkileri ile ilişkili olabileceği söylenebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

VPA ile indükleme metodu ile gerçekleştirdiğimiz deney hayvanı otizm modelleme çalışması sonucunda, otizmde görülen davranış bozuklukları, ve beyin dokusu histopatolojik incelemelerinde mikrogliya aktivasyonu, nöroenflamasyon belirlenmiş olup, bu bozuklukların iyileştirilmesi amacı için; üçü (fingolimod, suramin, ve N-asetil sistein) modern tıpta, ikisi ise (kirkumin ve resveratrol) tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamalarında (GETAT Geleneksel Tamamlayıcı Tıp) kullanılan, beş farklı etken maddelerin etkinlikleri araştırılmıştır. Histopatolojik bulguların (kramatolizis, fokal glia hücre infiltrasyonu ve nöronofaji alanı, nöronlar vakuolizasyon oluşumlar) onarılmasında Hastalık Kontrol grubuna nispet ile beş

etken maddelerinden oluşan bütün Tedavi Gruplarının iyileştirici etkileri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Histopatolojik bulguların iyileştirilmesinde fingolimodun en etkin madde olduğu bulunmuştur. Kognitif fonksiyonlar Water Maze davranış testleri ile incelenmiş olup, fingolimod, suramin, kurkumin, ve resveratrolün kognitif fonksiyonlar üzerine iyileştirici etkilerinin istatistiki olarak anlamlı düzeyde olduğu, N-asetil sisteinin ise anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Sakrifikasyon sonrası elde edilen beyin dokularından ELISA yöntemi ile yapılan IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA, GPX, CASP3 ölçümlerinde; fingolimodun GPX ve CASP3 miktarları üzerine azaltıcı etkisinin istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Otizmin etiopatogenezi ile ilişkili olduğu bilinen başlıca üç anafaktörlerden (genetik, epigenetik, ve çevresel faktörler) ekspresyonu ile otizm ilişkisi belirlenmiş olan CC2D1A genine ait mRNA ekspresyonu, RT-PCR yöntemi ile araştırılmış olup; CC2D1A geni ekspresyonu baskılama konusunda istatistiki anlamlı olarak fingolimodun en etkin olduğu, onu sırası ile kurkumin ve resveratrolün izlediği; suramin ve N-asetil sisteninin etkilerinin ise istatistiki anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak otizmde beyinde pek çok nöro-immünopatolojik değişiklikler meydana geldiği, belki de bunların sonucu olarak hem gen ekspresyonlarının uyarıldığı, hem de çeşitli davranış bozukluklarının geliştiği; modern tıpta kullanılan fingolimod ile tamamlayıcı ve alternatif tıpta kullanılan kurkumin ve resveratrolün, onarıcı ve iyileştirici etkilerinin olduğu, bunlar içerisinde ise fingolimodun en etkin madde olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abdelli, L.S., Samsam, A., Naser, S.A. (2019). Propionic Acid Induces Gliosis and Neuroinflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Sci Rep*,9(1):8824.
- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(1):40-59.
- Ahmad, S. F., Zoheir, K. M. A., Ansari, M. A., Nadeem, A., Bakheet, S. A., Al-Ayadhi, L. Y., Attia, S. M. (2017). Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related transcription factor signaling in children with autism. *Mol Neurobiol*, 54(6):4390-400.
- Akintunde, M. E., Rose, M., Krakowiak, P., Heuer, L., Ashwood, P., Hansen, R., Van de Water, J. (2015). Increased production of IL-17 in children with autism spectrum disorders and co-morbid asthma. *J Neuroimmunol*, 286:33-41.
- Al-Ayadhi, L. Y., Mostafa, G. A. (2012). Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J Neuroinflammation*,9:158.
- Al-Askar, M., Bhat, R.S., Selim, M., Al-Ayadhi, L., El-Ansary, A. (2017). Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. *BMC Complement Alternative Med*, 17:259.
- Al-Ayadhi, L. Y., Mostafa, G. A. (2013). Elevated serum levels of macrophage-derived chemokine and thymus and activation-regulated chemokine in autistic children. *J Neuroinflammation*,10:72.
- Albert, P.R., Le François, B., Millar, A.M. (2011). Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Mol Brain*,27;4:21.
- Al-Dbass, A.M. (2014). N- Acetylcysteine reduces the neurotoxic effects of propionic acid in rat pups. *J King Saud Uni Sci*, 26:254-60.
- Alemi, F., Kwon, E., Poole, D. P., Lieu, T., Lyo, V., Cattaruzza, F., Cevikbas, F., Steinhoff, M., Nassini, R., Materazzi, S., Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Cottrell, G.S., Schoonjans, K., Geppetti, P., Vanner, S.J., Bunnett, N.W., Corvera, C.U. (2013). The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *J Clin Invest*, 123(4):1513-30.
- Almeida, L.E., Boby, C.D., Krueger, B.K. (2014). Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. *Mol Cell Neurosci*,59:57-62.
- American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington, D.C., American Psychiatric Association.
- Anderson, G., Maes, M. (2014). Reconceptualizing adult neurogenesis: role for sphingosine-1-phosphate and fibroblast growth factor-1 in co-ordinating astrocyte-neuronal precursor interactions. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13(1):126-36.
- Arafat, E.A., Shabaan, D.A. (2019). The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism. *Acta Histochem*,121(7):841-851.
- Argyropoulos, A., Gilby, K.L., Hill-Yardin, E.L. (2013). Studying autism in rodent models: reconciling endophenotypes with comorbidities. *Front Hum Neurosci*, 25;7:417.

- Arneson, C. L., Durkin, M. S., Benedict, R. E., Kirby, R. S., Yeargin-Allsopp, M., Van Naarden Braun, K., Doernberg, N. S. (2009). Prevalence of cerebral palsy: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, three sites, United States, *Disabil Health J*, 2(1):45-8.
- Aroniadis, O.C., Brandt, L.J. (2013). Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol*, 29(1):79-8449.
- Ashwood, P., Anthony, A., Torrente, F., Wakefield, A. J. (2004). Spontaneous mucosal lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms: mucosal immune activation and reduced counter regulatory interleukin-10. *J Clin Immunol*, 24(6):664-73.
- Ashwood, P., Corbett, B. A., Kantor, A., Schulman, H., Van de Water, J., Amaral, D. G. (2011). In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One*, 6(5):e19299.
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*, 25(1):40-5.
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., Van de Water, J. (2011b). Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun*, 25(5):840-9.
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., Van de Water, J. (2011c). Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*, 232(1-2):196-9.
- Ashwood, P., Wills, S., Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol*, 80(1):1-15.
- Atladdottir, H. O., Thorsen, P., Ostergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40(12):1423-30.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280:G922-G929.
- Auerbach, B.D., Osterwil, E.K., Bear, M.F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 480(7375):63-8.2011.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44):15718-23.
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717):1915-20.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., M Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*, 25(1):63-77.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D.L., Maenner, M.J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C.G., White, T., Durkin, M.S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L.C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R.T., Hewitt, A., Pettygrove, S., Constantino, J.N., Vehorn, A.,

- Shenouda, J., Hall-Lande, J., Braun, K.V.N., Dowling, N.F. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years- Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*,67(6):1-23.
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Gustavo Della Flora Nunes, G.D.F., Gabriela Mueller de Melo, G.B., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Freire, V.N., Riesgo, R., Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci Lett*, 583:176-81.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*,18:767-811.
- Basel-Vanagiate, L., Attia R., Yahav, M., Ferland, R. J., Anteki, L., Walsh, C. A., Olender, T., Straussberg, R., Magal, N., Taub, E., Drasinover, V., Alkelai, A., Bercovich, D., Rechavi, G., Simon, A. J., Shohat, M. (2006). The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet*,3(3):203-10.
- Basel-Vanagiate, L., Taub, E., Halpern, G.J. Drasinover, V., Magal, N., Davidov, B., Zlotogora, J., Shohat, M. (2007). Genetic screening for autosomal recessive nonsyndromic mental retardation in an isolated population in Israel. *Eur J Hum Genet*, 15(2):250-3.
- Bayram, A. K., Kardas, F., Demirci, E. O., Gokahmetoglu, S., Ozmen, S., Canpolat, M., Per, H. (2016). Lack of serum antineuronal antibodies in children with autism. *Bratisl Lek Listy*, 117(2):77-9.
- Berdowska, A., Zwirska-Korczala, K. (2001). Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther*, 26(5):319-29.
- Bhandari, R., Kuhad, A. (2015). Neuropsychopharmacotherapeutic efficacy of curcumin in experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Life Sci*,141:156-69.
- Bhandari, R., Kuhad, A. (2017). Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Neurochem Int*,103:8-23.
- Bhat, A., Mahalakshmi, A.M., Ray, B., Tuladhar, S., Hediya, T.A., Manthiannem, E., Padamati, J., Chandra, R., Chidambaram, S.B., Sakharkar, M.K. (2019). Benefits of curcumin in brain disorders. *Biofactors*,45(5):666-689.
- Bisvas, S., Chen, S., Liang, G, Feng, B., Cai, L., Khan, z.a., Chakrabarti, S. (2019). Curcumin Analogs Reduce Stress and Inflammation Indices in Experimental Models of Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*,10:887.
- Bjorklund, G. (2013). The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *ActaNeurobiol Exp (Wars)*, 73(2), 225-36.
- Bjorklund, G., Saad, K., Chirumbolo, S., Kern, J. K., Geier, D. A., Geier, M. R., Urbina, M. A. (2016). Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *ActaNeurobiol Exp (Wars)*, 76(4):257-68.
- Blumberg, S. J., Bramlett, M. D., Kogan, M. D., Schieve, L. A., Jones, J. R., Lu, M. C. (2013). Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011-2012. *Natl Health Stat Report*, (65):1-11.
- Blundell, J., Blaiss, C.A., Etherton, M.R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M.F., Südhof, T.C., Powell, C.M. (2010). Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci*,30(6):2115-29.

- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., Gulyas, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B.T., Diamond, B., Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, 6:263ra158.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V. Escaravage, E, Savignac, H.M. Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(38):16050-5.
- Breece, E., Paciotti, B., Nordahl, C. W., Ozonoff, S., Van de Water, J. A., Rogers, S. J., Ashwood, P. (2013). Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum disorder and associated with amygdala volume and repetitive behaviors. *Brain Behav Immun*, 31:69-75.
- Bromley R.L., Mawer, G.E., Briggs, M., Cheyne, C., Clayton-Smith, J., García-Fiñana, M., Kneen R., Lucas, S.B., Shallcross, R., Gus A Baker, G.A., Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group. (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(6):637-43.
- Brown, A. S., Surcel, H. M., Hinkka-Yli-Salomaki, S., Cheslack-Postava, K., Bao, Y., Sourander, A. (2015). Maternal thyroid autoantibody and elevated risk of autism in a national birth cohort. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57:86-92.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., Pike, N.B., Strum, J.C., Stepkowski, K.M., Murdock, P.R., Holder, J.C., Marshall, F.H., Szekeres, P.G., Wilson, S., Ignar, D.M., Foord, S.M., Wise, A., Dowell, S.J. (2003). The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*, 278:11312-9.
- Brown, M.J., Willis, T., Omalu, B., Leiker, R. (2006). Deaths resulting from hypocalcemia after administration of edetate disodium: 2003- 2005. *Pediatrics*, 118(2):e534-6.
- Browne, T.R., Valproic acid. *N Engl J Med*, 1980;302:661-66.
- Brunkhorst, R., Kanaan, N., Koch, A., Ferreirós, N., Mirceska, A., Zeiner, P., Mittelbronn, M., Derouiche, A., Steinmetz, H., Foerch, C., Pfeilschifter, J., Waltraud Pfeilschifter, W. (2013). FTY720 treatment in the convalescence period improves functional recovery and reduces reactive astrogliosis in photothrombotic stroke. *PLoS One*, 8(7):e70124.
- Buie, T., Campbell, D.B., Fuchs, G.J., Furuta, G.T., Levy, J., Vandewater, J., Agnes H Whitaker, A.H., Atkins, D., Bauman M.L., Beaudet A.L., Edward G Carr, E.G., Gershon, M.D., Hyman S.L., Jirapinyo, P., Jyonouchi, H., Kooros, K., Kushak, R., Levitt, P., Levy, S.E., Lewis, J.D., Murray, K.F., Natowicz, M.R., Aderbal Sabra, A., Wershil, B.K., Weston, S.C., Zeltzer, L., Winter, H. (2010). Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with OSBs: a consensus report. *Pediatrics*, 125 Suppl 1:S1-18.
- Buie, T., Fuchs, G.J., Furuta, G.T., Kooros, K., Levy, J., Lewis, J.D., Barry K Wershil, B.K., Winter, H. (2010). Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with OSBs. *Pediatrics*, 125 Suppl 1:S19-29.
- Burnstock, G. (2006). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, 8(1):58-86.

- Burnstock, G. (2014). The Paton Lecture: Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol*, 99(1):16-34.
- Businaro, R., Corsi, M., Azzara, G., Di Raimo, T., Laviola, G., Romano, E., Ricci, S. (2016). Interleukin-18 modulation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation*, 13:2.
- Cabanlit, M., Wills, S., Goines, P., Ashwood, P., Van de Water, J. (2007). Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 1107:92-103.
- Cannell, J. J. (2013). Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Med Hypotheses*, 81(2), 195-8.
- Carr, G.V., Lucki, I. (2011). The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 213(2-3):265-87.
- Cezar, L.C., Kirsten, T.B., da Fonseca, C.C.N., de Lima A.P.N., Bernardi, M.M., Felicio, L.F. (2018). Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 84(Pt A):173-180.
- Chao, H.T., Chen, H., Samaco, R.C., Xue, M., Chahrour, M., Yoo, J., Neul, J.L., Gong, S., Lu, H., Heintz, N., Ekker, M., Rubenstein, J.L.R., Noebels, J.L., Rosenmund, C., Zoghbi, H.Y. (2010). Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*, 468(7321):263-9.
- Cheh, M.A., Millonig J.H., Roselli L.M., Ming, X., Jacobsen, E., Kamdar, S., Wagner, G.C. (2006). Knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res*, 1116(1):166-76.
- Chien, Y.L., Wu, Y.Y., Chiu, Y.N., Liu, S.K., Tsai, W.C., Lin, P.I., Chen, C.H., Gau, S.H.F., Wei-Hsien Chien, W.S. (2011). Association study of the CNS patterning genes and autism in Han Chinese in Taiwan. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(6):1512-7.
- Chirumbolo, S. (2015). The role of vitamin D towards immune tolerance in white adipose tissue (WAT). *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 15(4):277-87.
- Cho, S.C., Yim, S.H., Yoo, H.K., Kim, M.Y., Jung, G.Y., Shin, G.W., Kim, B.N., Hwang, J.W., Kang, J.J., Kim, T.M., Chung, Y.J. (2009). Copy number variations associated with idiopathic autism identified by whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization. *Psychiatr Genet*, 19(4):177-85.
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276):933-9.
- Christensen, D. L., Bilder, D. A., Zahorodny, W., Pettygrove, S., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among 4-Year-Old Children in the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *J Dev Behav Pediatr*, 37(1):1-8.
- Chubykin, A.A., Atasoy, D., Etherton, M.R., Nils Brose, N., Kavalali, E.T., Gibson, J.R., Südhof, T.C. (2007). Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron*, 54(6):919-31.
- Cipriani, R., Chara, J.C., Alfredo Rodríguez-Antigüedad, A., Matute, C. (2015). FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 12:86.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2012). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates

- the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*, 18(6):666-73.
- Collins, S. M., Surette, M., Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol*, 10(11):735-42.
- Connolly, A. M., Chez, M., Streif, E. M., Keeling, R. M., Golumbek, P. T., Kwon, J. M., Deuel, R. M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol Psychiatry*, 59(4):354-63.
- Coutinho, A.M., Sousa, I., Martins, M., Correia, C., Morgadinho, T., Bento, C., Marques, C., Ataíde, A., Miguel, T.S., Moore, J.H., Oliveira, G., Vicente, A.M. (2007). Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels. *Hum Genet*, 121(2):243-56.
- Cozzolino R, De Magistris L, Saggese P, Stocchero M, Martignetti A, Di Stasio M., Malorni, A., Marotta, R., Boscaino, F., Malorni, L. (2014). Use of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determination of urinary volatile organic compounds in autistic children compared with healthy controls. *Anal Bioanal Chem*, 406(19):4649-62.
- Craciun, E. C., Bjorklund, G., Tinkov, A. A., Urbina, M. A., Skalny, A. V., Rad, F., Dronca, E. (2016). Evaluation of whole blood zinc and copper levels in children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis*, 31(4):887-90.
- Croen, L. A., Braunschweig, D., Haapanen, L., Yoshida, C. K., Fireman, B., Grether, J. K., Van de Water, J. (2008). Maternal mid-pregnancy autoantibodies to fetal brain protein: the early markers for autism study. *Biol Psychiatry*, 64(7):583-8.
- Croonenberghs, J., Bosmans, E., Deboutte, D., Kenis, G., Maes, M. (2002). Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology*, 45(1):1-6.
- Croonenberghs, J., Wauters, A., Devreese, K., Verkerk, R., Scharpe, S., Bosmans, E., Maes, M. (2002). Increased serum albumin, gamma globulin, immunoglobulin IgG, and IgG2 and IgG4 in autism. *Psychol Med*, 32(8):1457-63.
- Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 13(10):701-12.
- Da Silva, S., Robbe-Masselot, C., Ait-Belgnaoui, A., Mancuso, A., Mercade-Loubiere, M., Salvador-Cartier, C., Gillet, M., Ferrier, L., Loubiere, P., Dague, E., Theodorou, V., Mercier-Bonin, M. (2014). Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307:G420-G429.
- Dana, H., Bayramov, K.G., Delibaşı, N., Tahtasakal, R., Bayramov, R., Zuhail Hamurcu, Z., Sener, E.F. (2020). Disregulation of Autophagy in the Transgenerational Cc2d1a Mouse Model of Autism. *Neuromolecular Med*, 239-249.
- David, S.P., Murthy, N.V., Rabiner, E.A., Munafó, M.R., Johnstone, E.C., Jacob, R., Walton, R.T., Grasby, P.M. (2005). A functional genetic variation of the serotonin (5-HT) transporter affects 5-HT_{1A} receptor binding in humans. *J Neurosci*, 9;25(10):2586-90.
- Dean, O., Giorlando, F., Berk, M. (2011). N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*, 36(2):78-86.
- De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D.I., Cristofori, F., Guerzoni, M.E., Gobbetti, M., Francavilla, R. (2013). Fecal microbiota

and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not other-wise specified. *PLoS One*, 8(10):e76993.

- De Simone, R., Butera, A., Armida, M., Pezzola, A., Boirivant, M., Potenza, R.L., Ricceri, R. (2020). Beneficial Effects of Fingolimod on Social Interaction, CNS and Peripheral Immune Response in the BTBR Mouse Model of Autism. *Neuroscience*, 435:22-32.
- de Theije, C.G., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., Garssen, J., Kraneveld, A.D., Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 37:197-206.
- de Theije, C.G., Pim, J. K., Korte-Bouws, G.A.H., da Silva, S.L., Korte, S.M., Olivier, B., Garssen, J., Kraneveld, A.D. (2014). Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 37:240-7.
- Denney, D. R., Frei, B. W., Gaffney, G. R. (1996). Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *J Autism Dev Disord*, 26(1):87-97.
- Deogracias, R., Yazdani, M., Dekkers, M.P.J., Guy, J., Ionescu, M.C.S., Vogt, K.E., Barde, Y. (2012). Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(35):14230-5.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V.B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T.S., Nunez, G., Martens, E.C. (2016). A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, 167:1339-53 e21.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry*, 19(2):146-8.
- Di Meo, F., Margarucci, S., Galderisi, U., Crispi, S., Peluso, G. (2019). Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection. *Nutrients*, 11:2426.
- Dong, S., Zeng, Q., Mitchell, E.S., Xiu, J., Duan, Y., Li, C., Tiwari, J.K., Hu, Y., Cao, X., Zhao, Z. (2012). Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS One*, 7(2):e31211.
- Duffney L.J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., Ma, K., Dietz, D.M., Kajiwara, Y., Buxbaum, J.D., Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep*, 11(9):1400-1413.
- Eapen, V. (2011). Genetic basis of autism: is there a way forward. *Curr Opin Psychiatr*, 24:226-36.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728):1635-8.
- Elamin, N. E., Al-Ayadhi, L. Y. (2014). Brain autoantibodies in autism spectrum disorder. *Biomark Med*, 8(3):345-52.
- Emond, P., Mavel, S., Aidoud, N., Nadal-Desbarats, L., Montigny, F., Bonnet-Brilhault, F., Barthélémy, C., Merten, M., Sarda, P., Laumonnier, F., Vourc'h, P., Blasco, H., Andres, C.R. (2013). GC-MS-based urine metabolic profiling of autism spectrum disorders. *Anal Bioanal Chem*, 405(15): 5291-300.

- Enstrom, A. M., Lit, L., Onore, C. E., Gregg, J. P., Hansen, R. L., Pessah, I. N., Ashwood, P. (2009). Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain Behav Immun*, 23(1):124-33.
- Enstrom, A. M., Onore, C. E., Van de Water, J. A., Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 24(1):64-71.
- Esparham, A. E., Smith, T., Belmont, J. M., Haden, M., Wagner, L. E., Evans, R. G., Drisko, J. A. (2015). Nutritional and Metabolic Biomarkers in Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Integr Med (Encinitas)*, 14(2):40-53.
- Estes, M. L., McAllister, A. K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, 16(8):469-86.
- Estes, M. L., McAllister, A. K. (2016). Maternal TH17 cells take a toll on baby's brain. *Science*, 351(6276):919-20.
- Faber, S., Zinn, G. M., Kern, J. C., Kingston, H. M. (2009). The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers*, 14(3):171-80.
- Farr, S.A., Poon, H.F., Dogrukol-Ak, D., Drake, J., Banks, W.A., Eyerman, E., Butterfield, D.A., Morley, J.E. (2003). The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *Neurochem*, 84(5):1173-83.
- FDA approves the first oral drug for reducing multiple sclerosis relapses. (2010). *Harv Womens Health Watch*, 18(4):5.
- Feliciano, P., Zhou, X., Astrovskaya, I., Turner, T.N., Wang, T., Brueggeman, L., Barnard, R., Hsieh, A., Snyder, L.G., Muzny, D.M., Sabo, A., SPARK Consortium; Gibbs, R.A., Eichler, E.E., Brian J O'Roak, B.J., Jacob J Michaelson, J.J., Volfovsky, N., Shen, Y., Chung, W.D. (2019). Exome sequencing of 457 autism families recruited online provides evidence for autism risk genes. *NPJ Genom Med*, 23;4:19.
- Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D.R., Green 3rd, J.A. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4):444-53.
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*, 65(6):591-8.
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Iohanna Deckmann, I., Gustavo Brum Schwingel, G.B., Nunes, G.D.F., Hirsch, M.M., Bauer-Negrini, G., Riesgo, R.S., Bambini-Júnior, V., Hedin-Pereira, C., Gottfried, C. (2018). Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Front Synaptic Neurosci*, 22;10:9.
- Frye, R.E., Slaterry, J., MacFabe, D.F., Allen-Vercoe, E., Parker, W., Rodakis, J., Adams, J.B., Krajmalnik-Brown, R., Bolte, E., Kahler, S., Jennings, J., James, J., Cerniglia, C.E., Midtvedt, T. (2015). Approaches to studying and manipulating the enteric microbiome to improve autism symptoms. *Microb Ecol Health Dis*, 26;26878.
- Furlano, R. I., Anthony, A., Day, R., Brown, A., McGarvey, L., Thomson, M. A., Murch, S. H. (2001). Colonic CD8 and gamma delta T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr*, 138(3):366-72.

- Furuta, G.T., Williams, K., Kooros, K., Kaul, A., Panzer, R., Coury, D.L., Fuchs, G. (2012). Management of constipation in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 130 Suppl 2: S98-105.
- Gabriele, S., Sacco, R., Persico, A.M. (2014). Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(6): 919-29.
- Gan, Z., Wei, W., Li, Y., Wu, J., Zhao, Y., Zhang, L., Wang, T., Zhong, X. (2019). Curcumin and resveratrol regulate intestinal bacteria and alleviate intestinal inflammation in weaned piglets. *Molecules*, 24: 1220.
- Garbett, K., Ebert, P.J., Mitchell, A., Lintas, C., Manzi, B., Mirnics, K., Persico, A.M. (2008). Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis*, 30(3): 303-311.
- Gao, F., Liu, Y., Li, X., Wang, Y., Wei, D., Jiang, W. (2012). Fingolimod (FTY720) inhibits neuroinflammation and attenuates spontaneous convulsions in lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rat model. *Pharmacol Biochem Behav*, 103(2): 187-96.
- Gao, R., Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr Mol Med*, 15(2): 146-67.
- Ghanizadeh, A., Akhondzadeh, S., Hormozi, M., Makarem, A., Abotorabi-Zarchi, M., Firoozabadi, A. (2012). Glutathione-related factors and oxidative stress in autism, a review. *Curr Med Chem*, 19(23): 4000-5.
- Ghanizadeh, A., Derakhshan, N. (2012). N-acetylcysteine for treatment of autism, a case report. *J Res Med Sci*, 17(10): 985-7.
- Ghahramani Seno, M.M., Hu, P., Gwadry, F.G., Pinto, D., Marshall, C.R., Casallo, G., Scherer, S.W. (2011). Gene and miRNA expression profiles in autism spectrum disorders. *Brain Res*, 1380: 85-97.
- Ghasemi, R., Dargahi, L., Ahmadiani, A. (2016). Integrated sphingosine-1 phosphate signaling in the central nervous system: From physiological equilibrium to pathological damage. *Pharmacol Res*, 104: 156-64.
- Ghezzi, A., Visconti, P., Abruzzo, P.M., Bolotta, A., Ferreri, C., Gobbi, G., Malisardi, G., Stefano Manfredini, S., Marini, M., Nanetti, L., Pipitone, E., Raffaelli, F., Resca, F., Vignini, A., Laura Mazzanti, L. (2013). Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features. *PLoS One*, 8(6): e66418.
- Gogolla, N., Leblanc, J.J., Quast, K.B., Südhof, T.C., Fagiolini, M., Hensch, T.K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord*, 1(2): 172-81.
- Goines, P. E., Croen, L. A., Braunschweig, D., Yoshida, C. K., Grether, J., Hansen, R., Van de Water, J. (2011). Increased midgestational IFN-gamma, IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Mol Autism*, 2: 13.
- Goldani, A.A., Downs, S.R., Widjajaj, F., Lawton, B., Hendren R.B. (2011). Biomarkers in autism. *Front Psychiatry*, 5: 100.
- Gondalia, S.V., Palombo, E.A., Knowles, S.R., Cox, S.B., Meyer, D., Austin, D.W. (2012). Molecular characterisation of gastrointestinal microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism Research*, 5(6): 419-27.

- Gonzales, E.L.T., Jang, J.H. Mabunga, D.F.N., Kim, J.V., Ko, M.J., Cho, K.S., Bahn, G.H., Minha Hong, M., Ryu, J.H., Kim, H.J., Cheong, J.H., Chan Young Shin, C.Y. (2016). Supplementation of Korean Red Ginseng improves behavior deviations in animal models of autism. *Food Nutr Res*,60:29245.
- Gorrindo, P., Williams, K.C., Lee, E.B., Walker, L.S., McGrew, S.G., Levitt, P. (2012). Gastrointestinal dysfunction in autism: parental report, clinical evaluation, and associated factors. *Autism Res*,5(2):101-8.
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., Savino, W. (2015). The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry*, 6:121.
- Grigorenko, E. L., Han, S. S., Yrigollen, C. M., Leng, L., Mizue, Y., Anderson, G. M., Bucala, R. (2008). Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 122(2):e438-445.
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Chiappedi, M., Manca, S., Ghezzi, A., Agliardi, C., Clerici, M. (2014). Activating KIR molecules and their cognate ligands prevail in children with a diagnosis of OSB and in their mothers. *Brain Behav Immun*, 36:54-60.
- Gupta, S., Aggarwal, S., Heads, C. (1996). Dysregulated immune system in children with autism: beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *J Autism Dev Disord*, 26(4):439-52.
- Gupta, S., Aggarwal, S., Rathanravan, B., Lee, T. (1998). Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J Neuroimmunol*, 85(1):106-9.
- Gupta, S., Caskey, A., Soares, N., Augustyn, M. (2018). Autism Spectrum Disorder and Mental Health Comorbidity Leading to Prolonged Inpatient Admission. *J Dev Behav Pediatr*, 39(6):523-5.
- Haftcheshmeh, S.M., Karimzadeh, M.R., Azhdari, S., Vahedi, P., Abdollahi, E., Momtazi-Borojeni, A.A. (2020). Modulatory effects of curcumin on the atherogenic activities of inflammatory monocytes: Evidence from in vitro and animal models of human atherosclerosis. *Biofactors*, 46(3):341-355.
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, A., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J.K., Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68(11):1095-102.
- Hanson, E., Kalish, L.A., Bunce, E., Curtis, C., McDaniel, S., Ware, J., Petry, J. (2007). Use of complementary and alternative medicine among children diagnosed with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*, 37(4):628-36.
- Hardan, A.Y., Fung, L.K., Libove, R.A., Obukhanych, T.V., Nair, S., Herzenberg, L.A., Frazier, T.W., Tirouvanziam, R. (2012). A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biol Psychiatry*, 71:956-61.
- Harrington, J.V., Rosen, L., Garnecho, A., Patrick, P.A. (2006). Parental perceptions and use of complementary and alternative medicine practices for children with autistic spectrum disorders in private practice. *J Dev Behav Pediatr*, 27(2 Suppl):S156-61.
- Haws, M.E., Jaramillo, T.C., Espinosa, F., Widman, A.J., Stuber, G.D., Sparta, D.R., Tye, K.M., Russo, S.J., Parada, L.F., Stavarache, M., Kaplitt, M., Bonci, A., Powell, C.M. (2014). PTEN knockdown alters dendritic spine/protrusion morphology, not density. *J Comp Neurol*, 522(5):1171-90.

- He, C.X., Portera-Cailliau, C. (2013). The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience*, 251:120-8.
- Heuer, L., Ashwood, P., Schauer, J., Goines, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Van de Water, J. (2008). Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res*, 1(5):275-83.
- Hirahara, K., Nakayama, T. (2016). CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*, 28(4):163-171.
- Holmay, M.J., Terpstra M., Lisa, D., Coles, L.D., Usha Mishra, U., Matthew Ahlskog, M., Gülin Öz, G., James C Cloyd, J.C., Paul J Tuite, P.J. (2013). N-Acetylcysteine boosts brain and blood glutathione in Gaucher and Parkinson diseases. *Clin Neuropharmacol*, 36(4):103-6.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291:881-4.
- Hornig, M., Bresnahan, M. A., Che, X., Schultz, A. F., Ukaigwe, J. E., Eddy, M. L., Lipkin, W. I. (2018). Prenatal fever and autism risk. *Mol Psychiatry*, 23(3):759-66.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Chow, J., Mazmanian, S. K., Patterson, P. H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31):12776-81.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H., Mazmanian, S.K. (2013). Microbiota modulated behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7): 1451-63.
- <http://www.nccam.nih.gov>
- Human Microbiome Project, C. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402):207-14.
- Hung, A:Y., Futai, K., Sala, C., Valtschanoff, J.G., Ryu, J., Woodworth, M.A., Kidd, F.L., Sung, C.C., Miyakawa, T., Bear, M.F., Weinberg, R.J., Sheng, M. (2008). Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J Neurosci*, 28(7):1697-708.
- Huuskonen, J., Suuronen, T., Nuutinen, T., Kyrölenko, S., Salminen, A. (2004). Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol*, 141(5):874-80.
- Hyman, P.E., Milla, P.J., Benninga, M.A., Davidson, G.P., Fleisher, D.F., Taminiau, J. (2006). Childhood functional gastrointestinal disorders: neonate/toddler. *Gastroenterology*, 130(5):1519-26.
- Ibrahim, S.H., Voigt, R.G., Katusic, S.K., Weaver, A.L., Barbaresi, W.J. (2009). Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, 124(2):680-6.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D.R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139:485-98.
- Int. Kay.1, <http://www.nccam.nih.gov/>, 18.03.2021
- Int. Kay.2, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CC2D1A/>, 18.03.2021

Int. Kay.3,<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2384831/18.03.2021/>,18.03.2021

- Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72(1):165-229.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Paris Autism Research International Sibpair Study. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34(1):27-9.
- James, S., Stevenson, S.W., Silove, N., Williams, K. (2015). Chelation for autism spectrum disorder (OSB). *Cochrane Database Syst Rev*, 5:CD010766.
- Jarrett, M., Heitkemper, M., Cain, K.C., Burr, R.L., Hertig, V. (2000). Sleep disturbance influences gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*, 45(5):952-9.
- Johansson, M.E., Larsson, J.M., Hansson, G.C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108(Suppl 1):4659-65.
- Jones, K.L., Croen, L.A., Yoshida, C. K., Heuer, L., Hansen, R., Zerbo, O., De Lorenze, G.N., Kharrazi, M., Yolken, R., Ashwood, P., Van de Water, J. (2017). Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Mol Psychiatry*, 22(2):273-279.
- Jyonouchi, H., Geng, L., Ruby, A., Zimmerman-Bier, B. (2005). Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. *Neuropsychobiology*, 51(2):77-85.
- Jyonouchi, H., Geng, L., Streck, D. L., Toruner, G. A. (2012). Immunological characterization and transcription profiling of peripheral blood (PB) monocytes in children with autism spectrum disorders (OSB) and specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD): case study. *J Neuroinflammation*, 9:4.
- Jyonouchi, H., Geng, L., Davidow, A. L. (2014). Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of OSB subjects: an inflammatory subtype? *J Neuroinflammation*, 11:187.
- Kajizuka, M., Miyachi, T., Matsuzaki, H., Iwata, K., Shinmura, C., Suzuki, K., Mori, N. (2010). Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(1):154-8.
- Kang, D.W., Park, J.G., Ilhan, Z.E., Wallstrom, G., Labaer, J., Adams, J.B., Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*, 8(7):e68322.
- Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., Depino, A.M. (2016). Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 72:11-21.
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., Hyland, N. P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*, 9:392.
- Kern, J. K., Geier, D. A., Geier, M. R. (2014). Evaluation of regression in autism spectrum disorder based on parental reports. *N Am J Med Sci*, 6(1):41-7.

- Kesper, L.J., Homberg, J.R. (2015). The neurodevelopmental effects of serotonin: a behavioural perspective. *Behav Brain Res*, 15;277:3-13.
- Khaled, E. M., Meguid, N. A., Bjorklund, G., Gouda, A., Bahary, M. H., Hashish, A., El-Bana, M. A. (2016). Altered urinary porphyrins and mercury exposure as biomarkers for autism severity in Egyptian children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis*, 31(6): 1419-26.
- Kim, H.J., Cho, M.E., Shim, W.H., Kim, J.K., Jeon, E.Y., Kim, D.H. Yoon, S.Y. (2017). Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Molecular Psychiatry*, 22:1576-84.
- Kini, U. (2006). Fetal valproate syndrome: A review. *Paediatr Perinat Drug Therapy*, 7(3):123-30.
- Kinoshita, M., Takeda, K. (2014). Microbial and dietary factors modulating intestinal regulatory T cell homeostasis. *FEBS Lett*, 588(22):4182-7.
- Korterink, J.J., Ockeloen, L., Benninga, M.A., Tabbers, M.M., Hilbink, M., Deckers-Kocken, J.M. (2014). Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*, 103(4):365-72.
- Kucharzik, T., Lugering, N., Rautenberg, K., Lugering, A., Schmidt, M.A., Stoll, R., Domschke, W. (2000). Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 915:171-83.
- Kwon, C.H., Luikart, B.W., Powell, C.M. Zhou, J., Matheny, S.A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S.J., Parada, L.F. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*, 50(3):377-88.
- Lau, N. M., Green, P. H., Taylor, A. K., Hellberg, D., Ajamian, M., Tan, C. Z., Alaedini, A. (2013). Markers of Celiac Disease and Gluten Sensitivity in Children with Autism. *PLoS One*, 8(6):e66155.
- Lee, E., Lee, J., Kim, E. (2017). Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biol Psychiatry*, 81(10):838-847.
- Levy, S.E., Hyman, S.L. (2003). Use of complementary and alternative treatments for children with autistic spectrum disorders is increasing. *Pediatr Ann*, 32(10):685-91.
- Li, N., Yang, J., Zhang, J., Liang, C., Wang, Y., Chen, B., Zhao, C., Wang, J., Zhang, G., Dongmei, Z., Liu, Y., Zhang, L., Yang, J., Li, G., Gai, Z., Zhang, L., Zhao, G. Correlation of Gut Microbiome Between ASD Children and Mothers and Potential Biomarkers for Risk Assessment. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 17(1):26-38.
- Li, Q., Han, Y., Dy, A. B. C., Hagerman, R. J. (2017). The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci*, 11:120.
- Li, Q., Zhou, J. M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 324:131-139.
- Li, S. O., Wang, J. L., Bjorklund, G., Zhao, W. N., Yin, C. H. (2014). Serum copper and zinc levels in individuals with autism spectrum disorders. *Neuroreport*, 25(15):1216-20.
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*, 207(1-2):111-6.
- Lin, L., Sun, W., Throesch, B., Kung, F., Decoster, J.T., Berner, C.J., Cheney, R.E., Rudy, B., Hoffman, D.A. (2013).

- Liu, F., Horton-Sparks, K., Hull, V., Li, R.W., Martínez-Cerdeño, V. (2018). The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Mol Autism*,10;9:61.
- Lopez-Cacho, J. M., Gallardo, S., Posada, M., Aguerri, M., Calzada, D., Mayayo, T., Cardaba, B. (2016). Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders. *J Investig Med*, 64(7):1179-85.
- Louis, P. (2012). Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig Dis Sci*, 57(8):1987-9.
- Lucchina, L., Depino, A.M. (2014). Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res*, 7(2):273-89.
- Lugo J.N., Smith G.D., Arbuckle E.P., White, J., Holley, A.J., Floruta, C.M., Ahmed, N., Gomez, M.C. Okonkwo, O. (2014). Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. *Front Mol Neurosci*,16;7:27.
- Luna, R. A., Savidge, T. C., Williams, K. C. (2016). The Brain-Gut-Microbiome Axis: What Role Does It Play in Autism Spectrum Disorder? *Curr Dev Disord Rep*, 3(1):75-81.
- Lyu, J., Yuan, B., Cheng, T., Qiu, Z., Zhou, W. (2016). Reciprocal regulation of autism-related genes MeCP2 and PTEN via microRNAs. *Sci Rep*, 6:20392.
- Ma, K., Qin, L., Matas, E., Duffney, Liu, Yan, Z. (2018). Histone deacetylase inhibitor MS-275 restores social and synaptic function in a Shank3-deficient mouse model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 43(8):1779-88.
- MacFabe, D. F., Cain, D. P., Rodriguez-Capote, K., Franklin, A. E., Hoffman, J. E., Boon, F., Ossenkopp, K. P. (2007). Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*, 176(1):149-69.
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K. P., Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*, 217(1):47-54.
- Macfarlane, S., Dillon, J.F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 102:1187-96.
- Macpherson, A., Khoo, U. Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., Bjarnason, I. (1996). Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut*, 38(3): 365-75.
- Madore, C., Leyrolle, Q., Lacabanne, C., Benmamar-Badel, A., Joffre, C., Nadjar, A., Laye, S. (2016). Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast*, 2016, 3597209.
- Maenner, M.J., Arneson, C.L., Levy, S.E., Kirby, R.S., Nicholas, J.S., Durkin, M.S. (2012). Brief report: association between behavioral features and gastrointestinal problems among children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*, 42(7):1520-5.
- Magid-Bernstein, J., Mahajan, K., Lincoln, J., Ming, X., Rohowsky-Kochan, C. (2015). Case report: cytokine and CD4+ T-cell profiles of monozygotic twins with autism and divergent comorbidities and drug treatment. *J Child Neurol*, 30(3):386-90.
- Malaguarneva, M., Khan, H., Cauli O. (2020). Resveratrol in Autism Spectrum Disorders: Behavioral and Molecular Effects. *Antioxidants*,9:188.

- Malavasi, F., Deaglio, S., Ferrero, E., Funaro, A., Sancho, J., Ausiello, C. M., Horenstein, A. L. (2006). CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol Med*, 12(11-12):334-41.
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol*, 22(1):361-8.
- Manzardo, A. M., Henkhaus, R., Dhillon, S., Butler, M. G. (2012). Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int J Dev Neurosci*, 30(2):121-7.
- Manzini, M.C., Xiong, L., Shaheen, R., Tambunan, D.E., Di Costanzo, S., Mitisalis, V., Tischfield, D.J., Cinquino, A., Ghaziuddin, M., Christian, M., Jiang, Q., Laurent, S., Nanjiani, Z.A., Rasheed, S., Hill, R.S., Lizarraga, S.B., Gleason, D., Sabbagh, D., Salih, M.A., Alkuraya, F.S., Walsh, C.A. (2014). CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF- κ B signaling homeostasis. *CellRep*, 8(3):647-55.
- Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., Guastella, A. J. (2015). Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 20(4):440-6.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, 22;22(21):3307-18.
- Martin, C.R., Osadcihi V., Kalani A., Mayer, E. A. (2018). The brain-gut-microbiome axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 6:133-48.
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun*, 79:75-90.
- Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Blasco, H., Bonnet-Brilhault, F., Barthelemy, C., Montigny, F., Sarda, P., Laumonnier, F., Vourc'h, P., Andres, C.R., Emond, P. (2013). 1H-13C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. *Talanta*, 114: 95-102.
- Mazurek, M.O., Vasa, R.A., Kalb, L.G., Kanne, S.M., Rosenberg, D., Keefer, A., Murray, D.S., Freedman, B., Lowery, L.A. (2013). Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol*, 41(1):165-76.
- McElhanon, B.O., McCracken, C., Karpen, S., Sharp, W.G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta- analysis. *Pediatrics*, 133(5):872-83.
- Meeking, M.M., MacFabe, D.F., Mephram, J.R., Foley, K.A., Tichenoff, L.J., Boon, F.H., Kavaliers, M., Ossenkop, K.P. (2020). Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 97:109794.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., Bisson, J.F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., Cazaubiel J.M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr*, 105(5):755-64.
- Michel, L., Prat A. (2016). One more role for the gut: microbiota and blood brain barrier. *Ann Transl Med*, 4:15.

- Ming, X., Stein, T.P., Barnes, V., Rhodes, N., Guo, L. (2012). Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *J Proteome Res*, 11(12):5856-62.
- Ming, X., Cheh, M.A., Yochum, C.L., Halladay, A.K., Wagner, G.C. Evidence of oxidative stress in autism derived from animal models. *Am J Biochem Biotechnol*, 4:2018-28.
- Molloy, C. A., Morrow, A. L., Meinzen-Derr, J., Schleifer, K., Dienger, K., Manning-Courtney, P., Wills-Karp, M. (2006). Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol*, 172(1-2):198-205.
- Molosh, A.I., Johnson P.L., Spence, J.P., Arendt, D., Federici, L.M., Bernabe, C., Janasik, S.P., Segu, Z.M., Khanna, R., Goswami, C., Zhu, W., Park, S.J., Li, L., Mechref, Y.S., Clapp, D.W., Shekhar, A. (2014). Social learning and amygdala disruptions in Nf1 mice are rescued by blocking p21-activated kinase. *Nat Neurosci*, 17(11):1583-90.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19:683-765.
- Mossa, A., Manzini, M.C. (2021). Molecular causes of sex-specific deficits in rodent models of neurodevelopmental disorders. *J Neurosci Res*, 99(1):37-56.
- Mostafa, G. A., Al-Ayadhi, L. Y. (2012). Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: relation to autoimmunity. *J Neuroinflammation*, 9:201.
- Mostafa, G. A., Bjorklund, G., Urbina, M. A., Al-Ayadhi, L. Y. (2016). The levels of blood mercury and inflammatory-related neuropeptides in the serum are correlated in children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis*, 31(3):593-9.
- Mostafa, G. A., Bjorklund, G., Urbina, M. A., Al-Ayadhi, L. Y. (2016b). The positive association between elevated blood lead levels and brain-specific autoantibodies in autistic children from low lead-polluted areas. *Metab Brain Dis*, 31(5):1047-54.
- Mühle, C., Reichel, M., Gulbins, E., Kornhuber, J. (2013). Sphingolipids in psychiatric disorders and pain syndromes. *Handb Exp Pharmacol*, (216):431-56.
- Naviaux, J.C., Wang, L., Li, K., Bright, A.T., Alaynick, W.A., Williams, K.R., Powell, S.B., Robert Naviaux, R.K. (2015). Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the Fragile X (Fmr1 knockout) mouse model. *Mol Autism*, 3;6:1.
- Naviaux, J.C. Schuchbauer, M.A., Li, K., Wang, L., Risbrough, V.B., Powell, S.B., Naviaux, R.K. (2014). Reversal of autism-like behaviors and metabolism in adult mice with single-dose antipurinergic therapy. *Transl Psychiatry*, 4(6):e400.
- Naviaux, R.K., Curtis, B., Li, K., Naviaux, J.C., Bright, A.T., Reiner, G.E., Westerfield, M., Goh, S., Alaynick, W.A., Wang, L., Capparelli, E.V., Adams, C., Sun, J., Jain, S., He, F., Arellano, D.A., Mash, L.E., Chukoskie, L., Lincoln, A., Townsend, J. (2017). Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. *Ann Clin Transl Neurol*, 4(7):491-505.
- Naviaux, R.K. (2014). Metabolic features of the cell danger response. *Mitochondrion*, 16:7-17.
- Naviaux, R.K., Zolkipli, Z., Wang, L., Nakayama, T., Naviaux, J.C., Le, T.P., Schuchbauer, M.A., Rogac, M., Tang, Q., Dugan, L.L., Powell, S.B. (2013). Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PLoS One*, 8(3):e57380.

- Nazari, M., Keshavarz, S. Rafati, A., Namavar, M.Z., Masoud Haghani, M. (2016). Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull*,124:95-102.
- Nickel, R.E., Gerlach, E.K. (2001). The use of complementary and alternative therapies by the families of children with chronic conditions and disabilities. *Inf Young Children*, 14(1):67-78.
- Nithianantharajah, J., Balasuriya, G., K., Franks, A.,E., Elisa L Hill-Yardin, E., L. (2017). Using Animal Models to Study the Role of the Gut-Brain Axis in Autism.*Curr Dev Disord Rep*,4(2):28-36.
- Oaks, A.W., Zamarbide, M., Tambunan, D.E., Santini, E., Di Costanzo, S., Pond, H.L., Johnson, M.W., Lin, J., Gonzalez, D.M., Boehler, J.F., Wu, G.K., Klann, E., Walsh, C.A., Manzini, M.C. (2017). Cc2d1a Loss of Function Disrupts Functional and Morphological Development in Forebrain Neurons Leading to Cognitive and Social Deficits.*Cereb Cortex*, 27(2):1670-1685.
- Oblak, A., Gibbs, T.T., Blatt, G.J. (2013). Reduced serotonin receptor subtypes in a limbic and a neocortical region in autism. *Autism Res*, 6(6):571-83.
- Ojo, E. S., Ishola, I. O., Ben-Azu, B., Afolayan, O. O., James, A. B., Ajayi, A. M., Adeyemi, O. O. (2019). Ameliorative influence of *Cnestis ferruginea vahl ex DC* (Connaraceae) root extract on kainic acid-induced temporal lobe epilepsy in mice: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *J Ethnopharmacol*, 243:112117.
- Onore, C., Careaga, M., Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*, 26(3):383-392.
- O’roak, B.J., State, M.W. (2008). Autism genetics: strategies, challenges and opprtunities. *Autism Res*, 1:4-17.
- Ozkul, Y., Taheri, S., Bayram, K.K., Sener, E.F., Mehmetbeyoglu, E., Öztop, D.B., Fatma Aybuga, F., Tufan, E. Bayram, A., Dolu, N., Zararsiz, G., Kianmehr, L., Beyaz, F., Doganyigit, Z., Cuzin, F., Rassoulzadegan, M. (2020). A heritable profile of six miRNAs in autistic patients and mouse models. *Sci Rep*,10(1):9011.
- Paintlia, M.K., Paintlia, A.S., Barbosa, E., Singh, I., Singh, A.K. N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res*,78(3):347-61.
- Pardo, C. A., Vargas, D. L., Zimmerman, A. W. (2005). Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry*, 17(6):485-495.
- Patel, J., Lukkes J.L., Shekhar A. (2018). Overview of genetic models of autism spectrum disorders. *Prog Brain Res*, 241:1-36.
- Peca, J., Peliciano C., Ting, J.T., Wang, W., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z., Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344):437-42.
- Peeters, B., Noens, I., Philips, E.M., Kuppens, S., Benninga, M.A. (2013). Autism spectrum disorders in childrenwith functional defecation disorders. *J Pediatr*,163(3):873-8.
- Pegorie M, Shankar K, Welfare WS, Wilson RW, Khiroya C, Munslow G, Fiefield, D., Bothra, V., McCann R. (2014). Measles outbreak in Greater Manchester, England, October 2012 to September 2013: epidemiologyand control. *Euro Surveill*, 19(49):20982.
- Persico, A.M., Napolioni, V. (2013). Autism Genetics. *Behav Brain Res*,251:95-112.

- Peters, B., Williams, K.C., Gorrindo, P., Rosenberg, D., Lee, E.B., Levitt, P., Veenstra-VanderWeele, J. (2014). Rigid-compulsive behaviors are associated with mixed bowel symptoms in autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*, 44(6):1425-32.
- Piras, I. S., Haapanen, L., Napolioni, V., Sacco, R., Van de Water, J., Persico, A. M. (2014). Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun*, 38:91-9.
- Poletaev, A. B., Poletaeva, A. A., Pukhalenko, A. I., Zamaleeva, R. S., Cherepanova, N. A., Frizin, D. V. (2014). Adaptive maternal immune deviations as a ground for autism spectrum disorders development in children. *Folia Med (Plovdiv)*, 56(2):73-80.
- Poletti, S., Leone, G., Hoogenboezem, T. A., Ghiglino, D., Vai, B., de Wit, H., Benedetti, F. (2019). Markers of neuroinflammation influence measures of cortical thickness in bipolar depression. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 285:64-6.
- Pop, A.S., Gomez-Mancilla, B., Neri, G., Willemsen, R., Gasparini F. (2014). Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(6):1217-26.
- Poulose, S.M., Miller, M.G., Scott, T., Shukitt-Hale, B. (2017). Nutritional Factors Affecting Adult Neurogenesis and Cognitive Function. *Adv Nutr*, 8(6):804-811.
- Provenzano, G., Zunino, G., Genovesi, S., Sgad , P., Bozzi, Y. (2012). Mutant mouse models of autism spectrum disorders. *Dis Markers*, 33(5):225-39.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*;118:229-41.
- Rangarajan, P., Karthikeyan, A., Dheen, S.T. (2016). Role of dietary phenols in mitigating microgli-mediated neuroinflammation. *Neuromol Med*,18:453-464.
- Rasquin, A., Di Lorenzo, C., Forbes, D., Guiraldes, E., Hyams, J.S., Staiano, A., Walker, L.S. (2006). Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent. *Gastroenterology*, 130(5):1527-37.
- Ricci, S., Businaro, R., Ippoliti, F., Lo Vasco, V. R., Massoni, F., Onofri, E., Archer, T. (2013). Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotox Res*, 24(4):491-501.
- Rogaeva, A., Galaraga, K., Albert, P.R. (2007). The Freud-1/CC2D1A family: transcriptional regulators implicated in mental retardation. *J Neurosci Res*, 85(13):2833-8.
- Rosenspire, A., Yoo, W., Menard, S., Torres, A. R. (2011). Autism spectrum disorders are associated with an elevated autoantibody response to tissue transglutaminase-2. *Autism Res*, 4(4):242-9.
- Ross, H. E., Guo, Y., Coleman, K., Ousley, O., Miller, A. H. (2013). Association of IL-12p70 and IL-6:IL-10 ratio with autism-related behaviors in 22q11.2 deletion syndrome: a preliminary report. *Brain Behav Immun*,31:76-81.
- Rossignol, D. A. (2007). Hyperbaric oxygen therapy might improve certain pathophysiological findings in autism. *Med Hypotheses*, 68(6):1208-27.
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., Mazmanian, S.K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 332:974-7.

- Ruggeri, B., Sarkans, U., Schumann, G., Persico, A. M. (2014). Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(6):1201-16
- Ruhela, R.K., Soni, S., Sarma, P., Prakash, A., Medhi, B. (2019). Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*, 26(1):25-31.
- Russo, F. B., Freitas, B. C., Pignatari, G. C., Fernandes, I. R., Sebat, J., Muotri, A. R., Beltrao-Braga, P. C. B. (2018). Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biol Psychiatry*, 83(7):569-78.
- Saad, K., Abdel-Rahman, A. A., Elserogy, Y. M., Al-Atram, A. A., Cannell, J. J., Bjorklund, G., Ali, A. M. (2016). Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. *Nutr Neurosci*, 19(8):346-51.
- Sakamoto, A., Moriuchi, H., Matsuzaki, J., Motoyama, K., Moriuchi, M. (2015). Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in children with autism spectrum disorder but no other major neurologic deficit. *Brain Dev*, 37(2):200-5.
- Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, Nelson, M.N., Wexler, H.M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*, 15(7):429- 35.
- Saresella, M., Marventano, I., Guerini, F. R., Mancuso, R., Ceresa, L., Zanzottera, M., Clerici, M. (2009). An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biol Psychiatry*, 66(10):978-84.
- Schleider, L.B., Mechoulam, R. Saban, N., Meiri, G., Novack, V. (2019). Real life Experience of Medical Cannabis Treatment in Autism: Analysis of Safety and Efficacy. *Sci Rep*, 17;9(1):200.
- Schneider, T., Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuro psychopharmacology*, 30(1):80-9.
- Scifo, R., Cioni, M., Nicolosi, A., Batticane, N., Tirolo, C., Testa, N., Marchetti, B. (1996). Opioid-immune interactions in autism: behavioural and immunological assessment during a double-blind treatment with naltrexone. *Ann Ist Super Sanita*, 32(3):351-9.
- Selvaraj, s., Amone, D., Cappai, A., Howes, O. (2014). Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*, 45:233-45.
- Sener, E.F., Uytun, M.C., Bayramov, K.K., Zararsiz, G., Oztop, D.B., Canatan, H., Ozkul Y. (2016). The roles of CC2D1A and HTR1A gene expressions in autism spectrum disorders. *Metab Brain Dis*, 31(3):613-9.
- Sener, E.F., Onal, M.G., Dal, F., Nalbantoglu, U., Ozkul, Y., Canatan, H., Oztop, D. B. (2020). Novel alterations of CC2D1A as a candidate gene in a Turkish sample of patients with autism spectrum disorder. *Int J Neurosci*, 1-8.
- Sharma, S., Mathur, A.G., Pradhan, S., Singh, D.B., Gupta, S. (2011). Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. *J Pharmacol Pharmacother*, 2(1):49-51.
- Sharon, G., Cruz, N. J., Kang, D. W., Gandal, M. J., Wang, B., Kim, Y. M., Mazmanian, S. K. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, 177(6):1600-1618 e1617.

- Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., Mazmanian, S. K. (2016). The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*, 167(4):915-32.
- Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C. Lane, C.J., Bramer, L.M., Isern, N.G., Hoyt, D.W., Noecker, C., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J.K., Knight, R., Metz, T.O., Lois, C., Daniel H Geschwind, D.H. Krajmalnik-Brown, R., Mazmanian, S.K. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, 177(6):1600-1618.e17.
- Sharpe, M. A., Gist, T. L., Baskin, D. S. (2013). Alterations in sensitivity to estrogen, dihydrotestosterone, and xenogens in B-lymphocytes from children with autism spectrum disorder and their unaffected twins/siblings. *J Toxicol*, 2013:159810.
- Shi, Z.Y., Li, Y.J., Zhang, K.J. Gao, X.C., Zheng, Z.J., Han, N., Zhang, F.C. (2012). Positive association of CC2D1A and CC2D2A gene haplotypes with mental retardation in a Han Chinese population. *DNA Cell Biol*, 31(1):80-7.
- Shultz, S. R., Macfabe, D. F., Martin, S., Jackson, J., Taylor, R., Boon, F., Cain, D. P. (2009). Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and sensorimotor ability in the Long-Evans rat: further development of a rodent model of autism. *Behav Brain Res*, 200(1):33-41.
- Shultz, S. R., MacFabe, D. F., Ossenkopp, K. P., Scratch, S., Whelan, J., Taylor, R., Cain, D. P. (2008). Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology*, 54(6):901-11.
- Singh, V. K. (1996). Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol*, 66(1-2):143-5.
- Siniscalco, D. (2015). Commentary: The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry*, 6:145.
- Siniscalco, D., Bradstreet, J. J., Cirillo, A., Antonucci, N. (2014). The in vitro GcMAF effects on endocannabinoid system transcriptionomics, receptor formation, and cell activity of autism-derived macrophages. *J Neuroinflammation*, 11:78.
- Siniscalco, D., Mijatovic, T., Bosmans, E., Cirillo, A., Kruzliak, P., Lombardi, V. C., Antonucci, N. (2016). Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. *In Vivo*, 30(2):83-9.
- Siu, W.K., Lam, C.W., Mak, C.M., Lau, E.T.K., Tang, M.Y., Tang, W.F., Poon-Mak, R.S., Lee, C., Hung, S., Leung, P.W.L., Kwong, K.L., Yau, E.K. Ng, G.S., Fong, N., Chan, K. (2016). Diagnostic yield of array CGH in patients with autism spectrum disorder in Hong Kong. *Clin Transl Med*, 5(1):18.
- Slattery, J., MacFabe, D. F., Frye, R. E. (2016). The Significance of the Enteric Microbiome on the Development of Childhood Disease: A Review of Prebiotic and Probiotic Therapies in Disorders of Childhood. *Clin Med Insights Pediatr*, 10:91-107.
- Son, J.S., Zheng, L.J., Rowehl, L.M., Tian, X., Zhang, Y., Zhu, W., Litcher-Kelly, L., Gadow K.D., Gathungu, G., Robertson, C.E., Ir, D., Frank, D.N., Li, E. (2015). Comparison of fecal microbiota in children with autism spectrum disorders and neurotypical siblings in the Simons Simplex Collection. *PLoS One*, 10(10):e0137725.

- Stamova, B. S., Tian, Y., Nordahl, C. W., Shen, M. D., Rogers, S., Amaral, D. G., Sharp, F. R. (2013). Evidence for differential alternative splicing in blood of young boys with autism spectrum disorders. *Mol Autism*, 4(1):30.
- Steinman, R. M. (2007). Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med*, 13(10):1155-9.
- Stilling, R.M., Ryan, F.J., Hoban, A.E., Shanahan, F., Clarke, G., Claesson, M.J., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2015). Microbes & neurodevelopment-absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala. *Brain Behav Immun*, 50:209-20.
- Stubbs, G. (1995). Interferonemia and autism. *J Autism Dev Disord*, 25(1):71-3.
- Sunand, K., Mohan, K.G., Bakshi, V. (2020). Supplementation of Lactobacillus probiotic strains supports gut-brain-axis and defends autistic deficits occurred by valproic acid-induced prenatal model of autism. *Pharmacogn J*, 12(6) Suppl:1658-69.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70(1):49-58.
- Sweeten, T. L., Posey, D. J., McDougle, C. J. (2003). High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry*, 160(9):1691-3.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., Südhof, T.C. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318(5847):71-6.
- Talkowski, M.E., Minikel E.V., Gusella J.F. (2014). Autism spectrum disorder genetics: diverse genes with diverse clinical outcomes. *Harv Rev Psychiatr*, 2:65-75.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84.
- Theoharides, T. C. (2013). Is a subtype of autism an allergy of the brain? *Clin Ther*, 35(5): 584-91.
- Tiequn, B., Guanqun, C., Shuo, Z. (2015). Therapeutic effects of Lactobacillus in treating irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Intern Med* 54(3):243-9.
- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Troten, B., Naliboff, B., Mayer, E.A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7):1394-1401 e1391-94.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspor, C., Cao, T., Matsui, T., Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*, 219:118-42.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr*, 141(5):769-76.
- Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., Hooper, L.V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:20858-63.
- Varatharaj, A., Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60:1-12.

- Van Echten-Deckert, G., Hagen-Euteneur, N., Karaca, I., Walter, J. (2014). Sphingosine-1-Phosphate: Boon and Bane for the Brain. *Cell Physiol Biochem*, 34(1):148-57.
- Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbo, S., Bruno, G., Simeone, G., Mele, G. (2015). Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(6):1077-85.
- Vojdani, A., Mumper, E., Granpeesheh, D., Mielke, L., Traver, D., Bock, K., McCandless, J. (2008). Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: the role of glutathione, IL-2 and IL-15. *J Neuroimmunol*, 205(1-2):148-54.
- Vuong, H. E., Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*, 81(5):411-23.
- Walker, L.S., Greene, J.W. (1989). Children with recurrent abdominal pain and their parents: more somatic complaints, anxiety, and depression than other patient families? *J Pediatr Psychol*, 14(2):231-43.
- Wang, B., Wu, G., Zhou, Z., Dai, Z., Sun, Y., Ji, Y., Wu, Z. (2015). Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids*, 47(10):2143-54.
- Wang, H., Liang, S., Wang, M., Gao, J., Sun, C., Wang, J., Xia, W., Wu, S., Sumner, S. J., Fengyu Zhang, F., Sun, C., Wu, L. (2016). Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism. *J Psychiatry Neurosci*, 41(1):27-37.
- Wang, L., Christophersen, C.T., Sorich, M.J., Gerber, J.P., Angley, M.T., Conlon, M.A. (2013). Increased abundance of *Sutterella spp.* and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Mol Autism*, 4(1):42.
- Wang, T., Guo, H., Xiong, B., Stessman, H.A.F., Wu, H., Coe, B.P., Turner, T.N., Liu, Y., Zhao, W., Hoekzema, K., Vives, L., Xia, L., Tang, M., Ou, J., Chen, B., Shen, Y., Xun, G., Long, M., Lin, J., Kronenberg, Z.N., Peng, Y., Bai, T., Li, H., Ke, X., Hu, Z., Zhao, J., Zou, X., Xia, K., Eichler, E.E. (2016). De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nat Commun*, 7:13316.
- Wang, T.T., Du, L., Shan, L., Jia, F. Y. (2014). Research advances in immunological dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 16(12):1289-93.
- Wang, T.T., Yuan, T., Zhang, Y. Z. (2014). Research progress on epstein-barr virus and its related lymphoma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 22(6):1775-9.
- Wang, X., Svedin, P., Nie, C., Lapatto, R., Zhu, C., Gustavsson, M., Sandberg, M., Karlsson, J., Romero, R., Hagberg, H., Mallard, C. (2007). N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol*, 61(3):263-71.
- Warren, R. P., Yonk, L. J., Burger, R. A., Cole, P., Odell, J. D., Warren, W. L., Singh, V. K. (1990). Deficiency of suppressor-inducer (CD4+CD45RA+) T cells in autism. *Immunol Invest*, 19(3):245-51.
- Warrier, V., Chee, V., Smith, P., Chakrabarti, B., Baron-Cohen, S. (2015). A comprehensive meta-analysis of common genetic variants in autism spectrum conditions. *Mol Autism*, 6:49.
- Wasilewska, J., Kaczmarowski, M., Stasiak-Barmuta, A., Tobolczyk, J., Kowalewska, E. (2012). Low serum IgA and increased expression of CD23 on B lymphocytes in peripheral blood in children with regressive autism aged 3-6 years old. *Arch Med Sci*, 8(2):324-31.

- Waters, A.M., Schilpzand, E., Bell, C., Walker, L.S., Baber, K. (2013). Functional gastrointestinal symptoms in children with anxiety disorders. *J Abnorm Child Psychol*, 41(1):151-63.
- Watts, G. (2007). Animal testing: is it worth it? *BMJ*, 334, 7586:182-4.
- Waye, M.Y., Cheng, H.Y. (2018). Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72:228-44.
- Wei, H., Alberts, I., Li, X. (2013). Brain IL-6 and autism. *Neuroscience*, 252:320-5.
- Williams, B.L., Hornig, M., Buie T, Bauman, M.L., Cho Paik, M., Wick, I., Bennett, A., Jabado, O., Hirschberg, D.L., Ian Lipkin, W. (2011). Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One*, 6(9):e24585.
- Wills, S., Cabanlit, M., Bennett, J., Ashwood, P., Amaral, D., Van de Water, J. (2007). Autoantibodies in autism spectrum disorders (OSB). *Ann N Y Acad Sci*, 1107:79-91.
- Wilson, V., Maulik, S.K. (2018). Herb-Drug Interactions in Neurological Disorders: A Critical Appraisal. *Curr Drug Metab*, 19(5):443-453.
- Wong, H.H., Smith, R.G. Patterns of complementary and alternative medical therapy use in children diagnosed with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 36(7):901-9.
- Wu, H., Wang, X., Gao, J., Liang, S., Hao, Y., Sun, C., Xia, W., Cao, Y., Wu, L. (2017). Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci*, 173:43-54.
- Wu, H., Zhang, Q., Gao, J., Sun, C., Wang, J., Xia, W., Cao, Y., Hao, Y., Wu, L. (2018). Modulation of sphingosine 1-phosphate (S1P) attenuates spatial learning and memory impairments in the valproic acid rat model of autism. *Psychopharmacology (Berl)*, 235(3):873-886.
- Wu T., Wang, H., Lu, W., Zhai, Q., Zhang, Q., Yuan, W., Zhennan Gu, Z., Zhao, J., Hao Zhang, H., Chen, W. (2020). Potential of gut microbiome for detection of autism spectrum disorder. *Microb Pathog*, 149:104568.
- Xu, N., Li, X., Zhong, Y. (2015). Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm*, 531518.
- Yamawaki, Y., Yoshioka, N., Nozaki, K., Ito, H., Oda, K., Harada, K., Akagi, H. (2018). Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res*, 1680:13-38.
- Yang, L.L., Millischer, V., Rodin, S., MacFabe, D.F., Villaescusa, J.C., Lavebratt, C. (2020). Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J Neurochem*, 154(6):635-646.
- Yap, I.K., Angley, M., Veselkov, K.A., Holmes, E. Lindon, J.C., Nicholson, J.K. (2010). Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res*, 9(6):2996-3004.
- Yen, H.Y., Tsao, C.W., Lin, Y.W., Kuo, C., Tsao, C., Liu, C. (2019). Regulation of carcinogenesis and modulation through Wnt/ β -catenin signaling by curcumin in an ovarian cancer cell line. *Sci Rep*, 9(1):17267.
- Yi F., Danko, T., Botelho, S.C., Patzke, C., Pak, C.H., Wernig, M., Südhof, T.C. (2016). Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science*, 352(6286):aaf2669.

- Yokoyama, S., Al Mahmuda, N., Munesue, T., Hayashi, K., Yagi, K., Yamagishi, M., Higashida, H. (2015). Association Study between the CD157/BST1 Gene and Autism Spectrum Disorders in a Japanese Population. *Brain Sci*, 5(2):188-200.
- Yonk, L. J., Warren, R. P., Burger, R. A., Cole, P., Odell, J. D., Warren, W. L., Singh, V. K. (1990). CD4+ helper T cell depression in autism. *Immunol Lett*, 25(4):341-5.
- Zablotsky, B., Black, L.I., Maenner, M.J., Schieve, L.A., Blumberg, S.J. (2015). Estimated prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Natl Health Stat Report*, 13;(87):1-20.
- Zamarbide, M., Oaks, A.W., Pond, H.L., Adelman, J.S., Manzini, M.C. (2018). Loss of the Intellectual Disability and Autism Gene Cc2d1a and Its Homolog Cc2d1b Differentially Affect Spatial Memory, Anxiety, and Hyperactivity. *Front Genet*, 9:65.
- Zamarbide, M., Mossa, A., Muñoz-Llancao, P., Wilkinson, M.K., Pond, H.L., Oaks, A.W., Manzini, M.C. (2019). Male-Specific cAMP Signaling in the Hippocampus Controls Spatial Memory Deficits in a Mouse Model of Autism and Intellectual Disability. *Biol Psychiatry*, 760-768.
- Zamarbide, M., Oaks, A.W., Pond, H.L., Adelman, J.S., Manzini, C.H. (2018). Loss of the Intellectual Disability and Autism Gene Cc2d1a and Its Homolog Cc2d1b Differentially Affect Spatial Memory, Anxiety, and Hyperactivity. *Front Genet*, 9:65.
- Zerbo, O., Iosif, A. M., Walker, C., Ozonoff, S., Hansen, R. L., Hertz-Picciotto, I. (2013). Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delays? Results from the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) study. *J Autism Dev Disord*, 43(1):25-33.
- Zerbo, O., Traglia, M., Yoshida, C., Heuer, L. S., Ashwood, P., Delorenze, G. N., Croen, L. A. (2016). Maternal mid-pregnancy C-reactive protein and risk of autism spectrum disorders: the early markers for autism study. *Transl Psychiatry*, 6:e783.
- Zerbo, O., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J., Ashwood, P., Delorenze, G. N., Croen, L. A. (2014). Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study. *J Neuroinflammation*, 11:113.
- Zhang, L., Ding, K., Wang, H., Wu, Y., Xu, J. (2016). Traumatic Brain Injury-Induced Neuronal Apoptosis is Reduced Through Modulation of PI3K and Autophagy Pathways in Mouse by FTY720. *Cell Mol Neurobiol*, 36(1):131-42.
- Zhang, Y., Cui, W., Zhai, Q., Zhang, T., Wen, X. (2017). N-acetylcysteine ameliorates repetitive/stereotypic behavior due to its antioxidant properties without activation of the canonical Wnt pathway in a valproic acid-induced rat model of autism. *Mol Med Rep*, 16(2):2233-2240.
- Zhang, Y., Sun, Y., Wang, F., Peng, Y., Li, R. (2012). Downregulating the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. *Neurochem Res*, 37(7):1409-19.
- Zhao, H. X., Yin, S. S., Fan, J. G. (2015). High plasma neopterin levels in Chinese children with autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci*, 41:92-7.
- Zhao, M., Raingo, J., Chen, Z.J., Kavalali, E.T. (2011). Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. *J Neurophysiol*, 105(4):1506-15.

- Zhong, H., Xiao, R., Ruan R., Liu, H., Li, X., Cai Y., Zhao, J., Fan, X. (2020). Neonatal curcumin treatment restores hippocampal neurogenesis and improves autism-related behaviors in a mouse model of autism. *Psychopharmacology (Berl)*,237(12):3539-3552.
- Zhou, J., Zhang, X., Ren, J., Wang, P., Zhang, J., Wei, Z., Tian, Y. (2016). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in valproic acid rat models of autism. *Mol Biol Rep*, 43(8):837-47.
- Zimmerman, A. W., Connors, S. L., Matteson, K. J., Lee, L. C., Singer, H. S., Castaneda, J. A., Pearce, D. A. (2007). Maternal antibrain antibodies in autism. *Brain Behav Immun*, 21(3):351-7.

