

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL UYGULANAN VALPROİK ASİT VE TRİPHENYL FOSFİTİN
YAVRU SIÇANLARIN ERGENLİK DÖNEMLERİNDEKİ DAVRANIŞSAL VE
HİPOKAMPAL DEĞİŞİKLİKLERE ETKİSİ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

HAZIRLAYAN

Petek BİLİM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral BAKA

İZMİR

2018

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL UYGULANAN VALPROİK ASİT VE TRİPHENYL FOSFİTİN
YAVRU SIÇANLARIN ERGENLİK DÖNEMLERİNDEKİ DAVRANIŞSAL VE
HİPOKAMPAL DEĞİŞİKLİKLERE ETKİSİ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

HAZIRLAYAN

Petek BİLİM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral BAKA

İZMİR

2018

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı	:	
Başkan(Danışman)	:	Prof. Dr. Meral BAKA
Üye / İmza	:	Prof. Dr. Eser SÖZMEN
Üye / İmza	:	Prof. Dr. Hatice MAVİOĞLU
Üye / İmza	:	
Üye / İmza	:	
Tezin Kabul Edildiği Tarih	:	04.07.2018

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2017-081

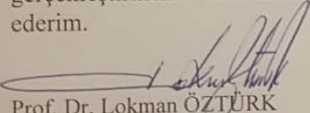
21.03.2018

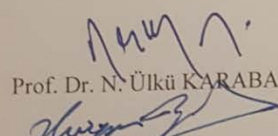
KONU: Onay

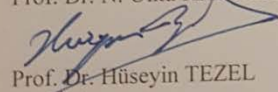
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “SIÇANLARDA MATERNAL UYGULANAN VALPROİK ASİT VE TRİPHENYL FOSFİTİN YETİŞKİN YAVRULARDA YAPISAL VE DAVRANIŞSAL SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

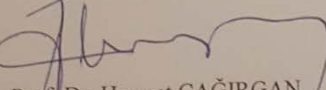
Yürütücü: Prof. Dr. Meral BAKA, E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.
YL Öğr. Petek BİLİM, E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.
YL Öğr. Kübra ÇELİK, E.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.
Öğr. Ahmet Giray YARDIMCI, E.Ü. Tıp Fakültesi
Öğr. Şura PAMUK, E.Ü. Tıp Fakültesi

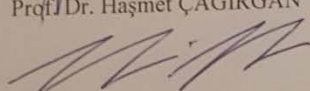
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

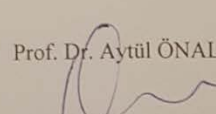

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

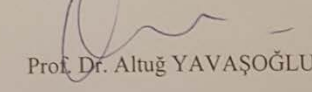

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

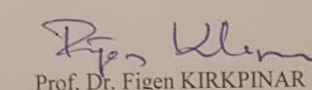

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

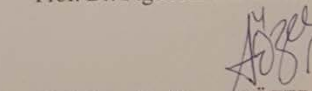

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

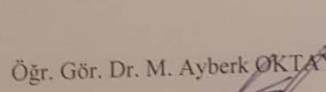

Prof. Dr. Uğur KAYA

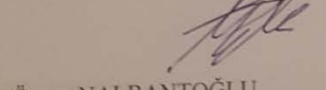

Prof. Dr. Aytül ÖNAL

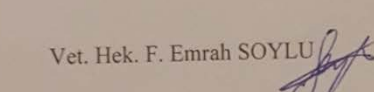

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

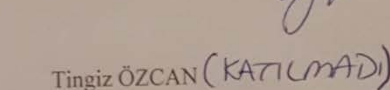

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR


Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI


Öğr. Gör. Dr. M. Ayberk OKTAY


Özcan NALBANTOĞLU


Vet. Hek. F. Emrah SOYLU


Tingiz ÖZCAN (KATILMADI)

ÖNSÖZ

Sinirbilim dünyasına özverili, yenilikçi, bilimsel adım atmamı sağlayan, bana çalışmamın her aşamasında ve her konuda engin bilgisi, farklı bakış açısıyla rehberlik eden sevgili danışman hocam Prof. Dr. Meral BAKA'ya çok teşekkür ederim.

Kapısını her çaldığımda samimi yaklaşımından ve hayvan davranışları konusundaki değerli yardımlarından ötürü sevgili Prof. Dr. Lütfiye KANIT'a ve davranış deneylerine sunduğu katkılardan ötürü değerli Prof. Dr. Dilek TAŞKIRAN'a çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimin ilk zamanlarından itibaren her zaman bana destek veren değerli hocam Prof. Dr. Banu Yazgan İNANÇ'a çok teşekkür ederim.

Beraber çalışmaktan keyif aldığım, ilk günden son anına kadar yanımda olan ekip arkadaşım Kübra ÇELİK'e ve titiz yaklaşımlarından ötürü Dr. Gurur GARİP'e çok teşekkür ederim.

Her katkısı ince ve sanat dolu canım dostum Bahar BAKAR başta olmak üzere tez dönemim boyunca yanımda olan bütün dostlarıma çok teşekkürler.

Ege Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ailesine, Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki çalışanlara destekleri ve katkıları için çok teşekkür ederim.

Son olarak her anımda yanımda hissettiğim, hayattaki en değerli varlığım ve en büyük şansım canım aileme sonsuz teşekkürler.

İzmir, 2018

Petek BİLİM

ÖZET

Otizm sosyal etkileşimdeki bozulmalar ve tekrar edici/basmakalıp davranışlar ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Nörogelişimsel bozuklukların ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Otizmi etkileyen genetik faktörlerin henüz tam olarak aydınlatılamaması ile beraber çevresel faktörler üzerine yapılan araştırmalar yoğunluk kazanmış ve gebelik döneminde maruz kalınan kimyasalların doğurduğu sonuçlar oldukça önemli bir boyuta ulaşmıştır. Çalışma günlük yaşamda maruz kalınan ve nörotoksik bir kimyasal olan Trifenil Fosfit ile otizm hayvan modellemelerinde kullanılan Valproik Asit'in maternal intraperitoneal enjeksiyonunun yavru sıçanların ergenlik dönemleri üzerindeki bilinmeyen etkilerini davranışsal ve hipokampal farklılıklar üzerinden araştırmak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla davranışsal testler ve histokimyasal boyama yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmelerden elde edilen bilgiler erken embriyonik dönemde Trifenil Fosfit ve Valproik Asit'e maruz kalan yavruların nörogelişimsel bozukluk gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bu yönüyle çalışma aynı zamanda gebelik döneminde çevresel kimyasallara karşı dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: otizm, valproik asit, trifenil fosfit, nörogelişim, maternal, hipokampus, davranış

ABSTRACT

Autism is a neurodevelopmental disorder characterized by distortions and repetitive/stereotyped behaviors in social interaction. Genetic and environmental factors are known to be effective in neurodevelopmental disorders. As genetic factors affecting autism have not been fully explained yet, studies on environmental factors have gained intensity and the results of the chemicals exposed during pregnancy have reached a considerable dimension. The study was planned to investigate the effects of maternal intraperitoneal injections of triphenyl phosphite; which is a neurotoxic chemical when exposed in daily life and Valproic Acid; which is used in autistic animal models, on adolescent rat behaviors and hippocampal differences. Behavioral tests and histochemical staining methods were used for this purpose. The data obtained from the evaluations revealed that the offspring exposed to Triphenyl phosphite and Valproic Acid in early embryonic period exhibited neurodevelopmental disorder. This study also emphasizes the need for caution against environmental chemistry during pregnancy.

Key Words: autism, valproic acid, triphenyl phosphite, neurodevelopment, maternal, hippocampus, behavior

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR.....	2
3.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI	3
3.1 Tarihçesi.....	3
3.2. Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı Kriterleri (DSM V)	3
3.3. Yaygınlığı	5
3.4. Tedavisi	5
3.5. Otizme Neden Olan Faktörler	5
3.5.1. Genetik Faktörler.....	5
3.5.2. Çevresel Faktörler	6
4.OTİZM HAYVAN MODELLERİ	8
4.1. VPA Modellemesi.....	8
4.2. Trifenil Fosfit.....	10
5.HİPOKAMPUS	12
5.1. Hipokampus Anatomisi	12
5.2. Hipokampus Histolojisi	12
5.3. Hipokampus Histogenezi.....	13
5.3.1. CA1 ve CA3 Piramidal Nöronlarının Göçü.....	14
5.3.2. Dentat Girusun Granüler Hücre Tabakasının Oluşumu	14
6. OTİZMDE GÖRÜLEN YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER.....	16
6.1. Hipokampus ve Otizm	16
7. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
7.1. Deneysel Materyaller	18
7.2. Yöntem	19
7.2.1. Araştırmada Kullanılan Deney Grupları	20
7.2.2. Kullanılan Maddeler.....	20
7.3. Davranış Testleri.....	21

7.3.1. Bilye Gömme Testi.....	22
7.3.2. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi.....	23
7.4. Deneyin Sonlandırılması ve Histolojik Takip.....	25
7.4.1. Kullanılan Tamponlar	25
7.4.2. Perfüzyon	25
7.4.3. Takip ve Parafine Gömme	27
7.4.4. Mikrotom ile Kesit Alma.....	28
7.5. Histokimyasal Boyalar.....	28
7.5.1. Hematoksilen ve Eosin.....	28
7.5.2. Toluidin Blue	28
7.5.3. Giemsa Boyası	29
7.5.4. Mallory & Azan.....	29
7.5.5. Luxol Fast Blue&Cresyl Violet Boyası	30
7.5.6. Cresyl Violet Boyası.....	30
8. İSTATİSTİK.....	31
9. BULGULAR	32
9.1. Bilye Gömme Testi.....	32
9.2. Sosyal Etkileşim Testi	33
9.3. Hipokampal Değişiklikler	34
10. TARTIŞMA	41
11. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
12. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Proestrus Dönemi	19
Şekil 2: Gebe Sıçanlar	20
Şekil 3: Yenidoğan Sıçanlar	21
Şekil 4: Bilye Gömme Testi	22
Şekil 5: Bilye Gömme Testinin Yapılışı.....	23
Şekil 6: Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi.....	24
Şekil 7: Perfüzyon	26
Şekil 8: Perfüzyon sonrası beyin	26
Şekil 9: Disseksiyon Mikroskop Görüntüsü.....	27
Şekil 10: Takip Sonrası Beyin	27
Şekil 11: Kontrol Grubu DG Görüntüleri	35
Şekil 12: Kontrol Grubu SGZ 40x Görüntüleri	35
Şekil 13: Kontrol Grubu CA1-CA2 ve Katmanların 20x Görüntüleri	36
Şekil 14: Kontrol Grubu CA3 20x Görüntüleri	36
Şekil 15: VPA Grubu 40x SGZ Görüntüleri	37
Şekil 16: VPA grubu DG Görüntüleri	37
Şekil 17: VPA grubu CA3 20x Görüntüleri	38
Şekil 18: VPA Grubu CA2-CA1 ve Katmanların 20x Görüntüleri.....	38
Şekil 19: TPP grubu DG 20x Görüntüleri	39
Şekil 20: TPP grubu SGZ 40x Görüntüleri.....	39
Şekil 21: TPP Grubu CA3 Görüntüleri.....	40
Şekil 22: TPP Grubu CA2-CA1 ve Katmanların 20x Görüntüsü.....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Gruplara Bilye Gömme Testi Sonuçları	32
Tablo 2: Gruplara göre Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi SI skorları.....	33
Tablo 3: Gruplara göre Sosyal Etkileşim Testi SPI skorları	34

KISALTMALAR LİSTESİ

- APA:** Amerikan Psikiyatri Derneği
BDNF: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
CA: Ammon Boynuzu
CV: Cresyl Violet Boyası
DG: Dentat Girus
DSM IV: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
DSM V: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
HDAC: Histon Deasetilaz
HE: Hematoksilen-Eozin Boyası
ICV: İntraserebroventrilüker Enjeksiyon
IZ: Intermediate Zon
LB%CV: Luxol Fast Blue&Cresyl Violet
MA: Mallory Azan Boyası
MAZ: Marjinal Zon
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
OSB: Otizm Spektrum Bozuklukları
VPA: Valproik Asit
PPA: Propiyonik Asit
TB: Toluidin Blue Boyası
TPP: Trifenil Fosfit
SGZ: Subgranüler Zon
SVZ: Subventriküler Zon
VZ: Ventriküler Zon

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nörogelişimsel bozukluklar embriyonik dönemde şekillenmeye başlayan, yaşam boyu devam eden bir ya da birden çok gelişim alanındaki yetersizliklerdir. Nörogelişimsel bozukluklardan biri de otizmdir ve bozulmuş sosyal etkileşim ile tekrarlayıcı davranışlarla karakterizedir (1). Otizme özgü davranış kalıpları, yapısal farklılıklar hayvan modelleri ile gösterilebilmektedir. Sıçanlara erken embriyonik dönemde Valproik Asit (VPA) enjeksiyonu sinir sisteminin yapısında ve davranışlarda bozulmalara neden olur. Ortaya çıkan bozulmalar otizm için model oluşturmaktadır (2). Trifenil Fosfit (TPP) ise çevrede yaygın olarak kullanılan ve gebelerinde maruz kaldıkları bir organofosfor bileşenidir (3).

Çalışma VPA'nın ve TPP'nin maternal maruziyetinin davranışsal sonuçları ile hipokampal yapıda oluşturdıkları farklılıkları incelemek amacı ile planlanmıştır.

2. NÖROGELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR

Nörogelişim süreci doğumdan önce başlayan ve doğumdan sonra da devam eden nörolojik açıdan çok karmaşık bir süreci ifade etmektedir (4).

Nörogelişimsel bozukluklar farklı gelişim alanlarındaki becerilerin kazanılamaması, gecikmesi veya bozulması olarak tanımlanmaktadır. Nörogelişimsel bozukluklarda etkilenen alanlar bilişsel, motor, sosyal ve dil olarak sayılabilir. Çocukluk çağında ortaya çıkmaya başlayan bu belirtiler farklı alanlarda kendilerini gösterirler. Belirtilerin altında yatan ana sebep anormal beyin gelişiminden kaynaklanmaktadır. Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı 5'e (DSM V) göre en yaygın nörogelişimsel bozukluklardan biri de otizm spektrum bozukluklarıdır (OSB) (5).

3. OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI

Otizm Spektrum Bozuklukları, sosyal etkileşimdeki ve iletişimdeki bozulmalar, tekrarlayıcı davranışlarla karakterizedir ve bir nörogelişimsel bozukluk kümesidir (6).

3.1 Tarihçesi

İnfanıl Otizm olarak ilk kez 1943 yılında çocuk psikiyatristi olan Leo Kanner'ın 11 çocukla yaptığı bir çalışma sonucunda tanımlanmıştır (7). Bu tanımlamaya rağmen otizm uzun bir dönem psikotik bozukluklardan ayırt edilememiştir. İlk olarak 1980'de Amerikan Psikiyatri Derneği'nin (APA) sınıflandırmasında "Yaygın Gelişimsel Bozukluk" başlığı altında ele alınmıştır (8).

DSM IV (2000)'e göre Otistik Bozukluk Yaygın Gelişimsel Bozuklukların 5 alt tipinden biri olarak sınıflandırılmıştır:

1. Otistik Bozukluk
2. Rett Bozukluğu
3. Çocukların Dezintegrafik Bozukluğu
4. Asperger Bozukluğu
5. Başka Türlü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk (Atipik Otizmi de kapsar) (9).

DSM IV otizm tanı kriterlerinde sosyal yetersizlikler, iletişim yetersizlikleri ve tekrarlayıcı/stereotipik davranışlar olmak üzere üç ayrı alan bulunmaktadır. DSM V'te ise sosyal iletişim yetersizlikleri ve tekrarlayıcı davranışlar olmak üzere iki ayrı alan tanımlanmıştır. Ayrıca Yaygın Gelişimsel Bozukluk ve alt tipleri kaldırılmış Otizm Spektrum Bozukluğu olarak isimlendirilmiştir (10).

3.2. Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı Kriterleri (DSM V)

DSM-V Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı Ölçütleri

A. Şimdi veya geçmişte farklı şekillerde görülen toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimde sürekli yetersizliğin olması.

1) Sosyal - duygusal karşılık vermede yetersizlik (örn. sıradışı toplumsal yaklaşma, karşılıklı konuşmada güçlük; ilgilerini, duygularını veya duygulanımını paylaşmada yetersizlik, sosyal etkileşime cevap vermeme gibi yetersizlikler.)

2) Sosyal etkileşim için kullanılan sözel olmayan iletişimsel davranışlarda yetersizlik (örn. sözel ve sözel olmayan iletişimde yetersizlikler, sıra dışı göz kontağı, beden dili veya jestleri anlamakta ve kullanmakta yetersizlik; yüz ifadesi ve beden dilinde bariz eksikler.)

3) İlişkileri geliştirmekte, devam ettirmekte ve anlamakta güçlük, Örneğin farklı toplumsal ortamlara uygun davranmamak, hayali oyunda yetersizlik, arkadaş edinememe ve arkadaşla ilgi duymama gibi.

Şu anki şiddeti: Şiddet sosyal iletişimsel alanda yetersizlikler ve kısıtlı, tekrarlayıcı davranışlara göre belirlenir.

B. Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren, şu an veya geçmişte sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ya da etkinlikler.

1) Basmakalıp veya tekrarlayıcı motor hareketler, nesne kullanımı veya konuşma (Basit motor stereotipiler, oyuncakları dizme veya çevirme, ekolali, kendine özgü cümleler)

2) Aynılıkta ısrarcılık, rutinelere sıkı sıkıya bağlı olma veya ritüelleşmiş sözel ve sözel olmayan davranışlar, (önemsiz değişikliklerde aşırı kaygı, geçişlerde zorlanma, katı düşünce tarzı, selamlaşma ritüelleri, her gün aynı yolu veya aynı yemeği tercih etme gibi.)

3) Konu veya yoğunluk açısından sıra dışı sınırlı, sabit ilgiler (sıradışı nesnelere anormal aşırı bağlılık, aşırı tekrarlayıcı veya sınırlı ilgiler.)

4) Duyusal olarak aşırı ya da az duyarlılık veya uyaranların duyusal boyutuna aşırı ilgi (acıya/sıcağa aşırı duyarsızlık, belirli ses veya dokunuşlara karşı beklenmeyen tepki, nesneleri aşırı koklama veya onlara aşırı dokunma, ışık veya hareketle görsel olarak çok meşgul olma).

Şu anki şiddeti: Şiddet sosyal iletişimsel alandaki yetersizlikler ve kısıtlı, tekrarlayıcı davranışlara göre belirlenir.

C. Belirtiler erken gelişim dönemlerinde mevcut olmalı (toplumsal beklenti sınırlarını aşınca dek fark edilmemiş veya daha sonra öğrendiği yollarla gölgelenmiş olabilir.)

D. Belirtiler sosyal, mesleki ve başka önemli alanlarda klinik olarak anlamlı düzeyde bozukluğa yol açmalıdır.

E. Bu bozukluk zihinsel yetersizlik veya genel gelişimsel gerilik sebebi ile olmamalıdır.

Gerçi zihinsel yetersizlik ve OSM sıklıkla bir arada görülür, ancak OSB ve zihinsel engellilik tanısı konması için sosyal iletişimsel düzeyin genel gelişimin altında olması gerekir.

Not: DSM-IV'e göre otistik bozukluk, Asperger bozukluğu ve YGB-BTA tanısı almış olanlara OSB tanısı verilmelidir. Sosyal iletişimsel alanda problem olan ancak OSB tanısı almayanlar sosyal (pragmatic) iletişimsel bozukluk açısından değerlendirilmelidir.

- Zihinsel yetersizliğin eşlik edip etmediğini,
- Dil yetersizliğinin eşlik edip etmediğini
- Bilinen bir tıbbi, genetik veya çevresel faktörün eşlik edip etmediğini,
- Başka nörogelişimsel, ruhsal veya davranışsal durumların olup olmadığını,
- Katatoninin eşlik edip etmediğini belirtiniz (10).

3.3. Yaygınlığı

Yapılan son çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre otizmin görülme sıklığı 1000'de 14.6 olarak bildirilmiştir (her 68 çocuktan bir tanesi). Kızlarda görülme oranı 1000'de 5.3 iken, erkeklerde bu oran 1000'de 23.6'a yükselmiştir (11).

Görülme sıklığı zaman içinde artmıştır fakat bu artışın bozukluğa ait vaka sayısını yansıtmadığı tam olarak net değildir. Görülme sıklığındaki yükselen oranın otizme dair farkındalığın artışı, bozukluğun tanı kriterleri ve toplumun algısı gibi kültürel faktörlerin etkisinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir (12).

3.4. Tedavisi

Otizm yaşam boyu devam eden bir bozukluktur ve henüz tam olarak tedavisi yoktur. Bu nedenle otizmi tam olarak tedavi edebilen farmakolojik bir ajan bulunmamaktadır fakat yeme ve uyku bozuklukları gibi durumlara etki etmesi amacı ile ilaç kullanılabilir aynı zamanda erken tanı ile beraber uyum becerileri artırılabilir (13). Bunun yanı sıra terapötik yaklaşımlar, davranışsal alıştırmalar belirli semptomları gidermek üzere tasarlanmıştır ve iyileştirici etkileri bulunmaktadır. (14).

3.5. Otizme Neden Olan Faktörler

3.5.1. Genetik Faktörler

Otizme neden olabilecek etkenler arasında genetik faktörlerin de rol oynadığı; otizmlili kişilerin kromozomlarındaki bozukluklar ve ailesel yatkınlıkları üzerine

yapılan çalışmalarla gösterilmesine rağmen aralarındaki ilişki hala tam olarak açıklanamamaktadır.

Genetik çalışmalarla otizm tanısına veya ortaya çıkmasına neden olan genler aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Otizmlı kardeşler üzerinde yapılan incelemelerle mutasyon, delesyon, duplikasyon olan genler üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak klinik açıdan hala kesin kanıtlar ortaya koyulamamıştır (15).

İkizler üzerinde otizmin genetik kalıtım ilgisinin araştırıldığı çalışmalarda, tek yumurta ikizlerinin her ikisinde de otizm görülme oranının çift yumurta ikizlerine oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (16-19).

Ailesel yatkınlık çalışmaları, otizm üzerine hem genetik hem de çevresel faktörlerin gösterildiği araştırmalardır. Yapılan bir çalışmada otizmlı çocuğa sahip ailenin diğer çocuklarında da bu bozukluğun görülme riskinin normalin 22 katı olduğu gösterilmiştir (20). Bunun yanı sıra, OSB'nin tek yumurta ikizlerinde bile farklı şiddette seyretmesinden yola çıkarak çevresel etkenlerin de oldukça etkili olduğu görülmektedir (21). Beyindeki büyümeyi kontrol eden ve hücreler arası iletişimi düzenleyen genlerde bir kusur olma ihtimali ile beraber çevresel faktörlerin genlerin çalışma sistemleri üzerindeki etkileriyle otizmin doğum öncesi beyin gelişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (14).

3.5.2. Çevresel Faktörler

Otizm ile ilişkilendirilen genetik sebepler otizmin sebebini tam olarak açıklayamamaktadır. Babanın ileri yaşı, annenin yaşı ve geçirdiği hastalıklar, virüsler, bağışıklık sistemindeki normal olmayan süreçler, doğum anı ile ilgili olumsuz durumlar, gebe iken maruz kaldığı kimyasallar otizme sebep olabilecek çevresel etkenler arasında sayılabilir (22-26). Diyet ve gastrointestinal faktörler de otizm spektrum bozukluklarına (OSB) katkıda bulunabilir (27).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bilgilere göre maternal rubella enfeksiyonu, etanol, talidomid ve valproik asite ilk trimesterde maruz kalınması otizm riskini arttırmaktadır (28).

Endüstride kullanılan bazı kimyasalların nörogelişimsel bozulmalara neden olabileceğine dair yapılan çalışmalar giderek artmıştır. Beyin gelişimi oldukça karmaşık bir süreç olarak tanımlanır ve bu süreçte kısıtlayıcı, durdurucu faktörler gelişimde hasarlara neden olabilir ve sonuçları yaşam boyu görülebilir. Hayvanlar üzerindeki çalışmalar, çok çeşitli endüstriyel kimyasalların olgun organizmalar için

zararlı olmayan düşük dozlarda gelişimsel nörotoksositeye neden olabileceği fikrini desteklemektedir. Endüstriyel kimyasalların bilinenden çok daha fazla ve belirlenmeyen etkileri olabilir. Bu kimyasalların milyonlarca çocuğun gelişmekte olan beyinde zarar oluşturduğu ile ilgili veriler elde edilmiş olmasına rağmen mevcut tüm etkiler istatistiksel olarak net değildir (29).

Otizme sebep olan çevresel etkenler beraber düşünüldüğünde kimyasalların önemli bir yer tuttuğu görülmektedir. TPP de maternal dönemde yaygın olarak maruz kalınan bir kimyasaldır. Tüm bu bilgiler ışığında TPP'nin nörogelişimsel bozuklar ve otizm ile ilişkisi henüz bilinmemektedir.

4. OTİZM HAYVAN MODELLERİ

Hayvan modellemeleri henüz tam olarak anlaşılamayan nöropsikiyatrik ve nörogelişimsel bozuklukların mekanizmalarının anlaşılması için geliştirilmiştir. Bozukluklar birebir insandaki gibi oluşturulmasa da ideal hayvan modeli araştırmacılara yapısal, davranışsal ve bilişsel anormallikleri değerlendirebilecek, etkin tedavi denemelerine olanak sağlayacak şekilde olmalıdır (30, 31). Otizm modellemeleri günümüzde kimyasallar ve genetik manipülasyonlarla gerçekleştirilmektedir.

Otizm ile ilişkilendirilen birkaç mutasyon vardır fakat bu mutasyonların sinir sistemi üzerinde oluşturduğu değişiklikler ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. Otizimli insanlarda görülen mutasyonlar fareler üzerinde modellenerek nöroglin (NL), neurexin, şaft, Mecp2, Foxp, Cntap2, Ube3a ve Tsc1 / Tsc2 proteinlerini kodlayan genlerdeki manipülasyon davranışsal ve fizyolojik sonuçlar hayvan deneyleri için uygun çalışma imkanı sunmaktadır (32, 14).

Kimyasallar ile gerçekleştirilen modellerden bir tanesi Propiyonik asit (PPA) ile indüklenir. PPA, kısa zincirli bir yağ asidi olmakla beraber, enterik bakterilerin son ürünlerinden biridir. Uygulanma şekli ise intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyon ile gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalar ile otizimli insanlardaki davranışsal ve anatomik değişikliklerin hayvan modellerinde saptandığı kaydedilmiştir (33, 34).

Kimyasallar ile oluşturulan modellerden bir diğeri de maternal VPA maruziyetidir. Erken embriyonik dönemde fetüsün beyin gelişimi zararlı etkilere karşı savunmasız durumdadır. İnsanlardaki klinik bulguları destekler nitelikte VPA'nın sıçanlar üzerindeki modellemesi E12.5'ta maternal olarak uygulanmasıdır. TPP'nin de çevrede bulunan ve gebelik döneminde maruz kalınan bir kimyasal olması nedeniyle çalışmamızda davranışsal, yapısal sonuçların araştırılması ve karşılaştırılması için VPA modeli tercih edilmiştir.

4.1. VPA Modellemesi

VPA ya da 2-proilpentanoik asit epilepside, duygudurum bozukluklarında düzenleyici olarak kullanılan bir kimyasaldır (35). VPA gen ekspresyonlarını histon deasetilaz (HDAC) aktivitesini inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenler ve sinir iletimini etkiler (36). Embriyonik dönemde gerçekleşecek HDAC inhibisyonu

nörogelişimsel süreci sekteye uğratarak bozulmalara ve nörogelişimsel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (37).

VPA'ya gebelik döneminde maruz kalma doğumda komplikasyonlar, doğum zamanında gecikmeler, yavruların bilişsel becerilerinde düşüş ve yavrularda otizmin görülme riskinin yükselmesi ile sonuçlanabilmektedir (38). Gebelik sırasında VPA'nın yüksek doz kullanımında ise nöral tüp bozuklukları görülebilir ayrıca kardiyovasküler, üriner, pulmoner ve kas iskelet sistemi gibi pek çok sistemi etkileyebilir (39).

Maternal olarak VPA'ya maruz kalan çocuklarda 3 yaşında sözel becerilerde ve zeka seviyelerinde düşüş olduğu kaydedilmiştir (40). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar da klinik bulguları destekler niteliktedir. Yavru sıçanlarda duyuşal, iletişimsel ve sosyal davranışlarda bozulmalar görülmüştür (41, 42). Erken embriyonik dönemde VPA'nın uzun süreli fetüsün nöral gelişimini de olumsuz etkilediğı saptanmıştır. Tüm bu bilgiler beraber değerlendirildiğinde intrauterin uygulanan VPA yavru sıçanlar için kullanılan geçerli bir otizm modelidir (38).

VPA otizm modellerinde embriyonik gelişimin 12-12.5 günlerinde (E12-E12,5) gebe sıçanlara uygulanmaktadır böylece yavruların sinir sistemi hücrelerinde apoptozis başta olmak üzere çeşitle hücre ölümlerini aktive etmekte veya bazı beyin bölgelerinde aşırı büyümeye neden olabilmektedir. E12.5'ta VPA maruziyeti prefrontal ve somatosensör kortekste nörogenezde aksamalara ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. Gelişim sürecinde görülen bu anormallikler dikkat bozukluğu başta olmak üzere birçok davranışsal bozukluk ile sonuçlanmaktadır (37, 38). VPA modellemesinde nörogelişimsel bozuklukların belirtileri olan sosyal etkileşimde bozulmalar, tekrarlayıcı davranışların artışı, göz kapaklarının açılmasında gecikme, ağırlı uyaranlara verilen anormal tepkiler ve sesli uyaranlara karşı verilen tepkilerde azalma veya tepkisizlik davranışları ortaya çıkmaktadır (2). Yavru sıçanların olfaktörük sisteminde görülen gelişimsel bozulmalar, sosyal etkileşim ve keşif davranışlarını etkilemektedir (43). Sosyal etkileşimdeki bozulmalara ek olarak yavru sıçanlarda görülen temizlenme hareketleri, bilye gömme testi ile ölçülen kazıma ve tekrar edici davranışları artmaktadır. Bu bulgular maternal dönemde maruz kalınan VPA'nın yavru sıçanlardaki otizm ve benzeri davranışları geliştirdiğini kanıtlamaktadır (44). Yapılan bir çalışma ile VPA maruziyetinde E12.5. günün

önemi vurgulanmış ve E9 veya E14,5 uygulamalarının sosyal etkileşimde bozulmalara neden olmadığı gösterilmiştir (45).

E12,5. günde uygulanan VPA'nın kraniyal sinirlerin nukleuslarında bozulmalara, kraniyal nöronlarda ölüme yol açarak nöronlarda azalmalara, motor korteksteki piramidal hücrelerin dendritik dallanması normaline göre farklılık gösterdiği saptanmıştır (46). Ayrıca prefrontal kortekste dendritik spin yoğunluğunda azalış fakat hipokampusun ventral kısmında artış görülmüştür. Bu farklılığın sebebi ise sinaptik bağlantıların beyindeki bölgelere göre yoğunluğunun aynı oranda olmamasıdır. Yapılan çalışmalardan edinilen bilgilere göre hipokampus ve serebellumda granüler hücrelerin ölüme gittikleri görülmüştür (47). VPA'nın hipokampusteki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

VPA modelinde otizm benzeri davranışlara eşlik eden ve klinik bulgularla örtüşen anksiyete davranışlarında artış, sirkadyen ritim bozuklukları, göz kırpma davranışlarında farklılıklar da mevcuttur (38).

4.2. Trifenil Fosfit

TPP böcek öldürücü ve mantar önleyici olarak tarımda, sabitleyici, aşınmayı önleyici katkı maddesi olarak plastik ve kauçuk sanayisinde ve epoksi reçinesinde kullanılmaktadır. TPP bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve tip II olarak sınıflandırılan organofosfor kaynaklı nörotoksik bir ajandır. TPP maruziyetinden bir süre sonra gecikmeli şekilde ataksi, felç ve sinir sisteminde değişikliklere neden olmaktadır. Smith ve arkadaşları TPP'nin nörotoksitesine dikkat çeken ilk araştırmaları gerçekleştirerek fenol esterleri üzerinde aril fosfitin akut veya çoklu maruziyette kedilerde gözlenen yüksek oranda kilo kaybı kaydetmişlerdir. Sonrasında TPP'nin nörotoksik bir ajan olduğuna dair yapılan araştırmalar ve veriler giderek artmıştır (48, 49, 50).

TPP'nin 1184mg/kg dozunda uygulanmasından sonra yapılan incelemeler ile serebellum, vestibüler kompleks, koklear çekirdekler, superior ve inferior colliculide aksonal ve terminal dejenerasyon görülmüştür. Subtalamik çekirdek, substantia nigra, septal bölge, hipotalamus, talamus, hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde dejeneratif aksonlar ve terminaller içerdiği görülmüştür. Dejenerasyon özellikle sensorimotor serebral korteks, medidorsal, ventromedial ve medial genikulat talamik çekirdeklerde ve hipotalamustaki magnosellüler preoptik ve medial

mamillar çekirdeklerinde belirgin olduğu ve düşük oranda fasikulus gracilis ve çekirdeğinde dejenerasyon kaydedilmiştir (51).

TPP'nin toksik olmayan dozu (250 mg/kg) Levin ve ark.larının yaptığı bir çalışmada erkek sıçanlara uygulanmış ve 4 gün sonra davranış deneyine alınmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre TPP grubunun, kontrol grubuna kıyasla öğrenmelerinde bozulmalar görülmüştür (48).

Merkezi ve çevresel sinir sistemindeki birçok alanın TPP maruziyetinden sonra dejenere olduğu pek çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir fakat gebeler ve doğacak yavrular üzerindeki yapısal ve davranışsal etkileri henüz aydınlatılmamıştır. Maternal uygulanan TPP'nin nörogelişimsel bozukluklardakine benzer sonuçlara neden olup olmayacağı, otizm modellemesinde kullanılıp kullanılamayacağı bu nedenle önemlidir. İnsanların sosyal davranışlarının ortaya çıkmasını sağlayan mekanizmalar ve kimyasallar tam olarak aydınlatılamamıştır. İnsan beyninin karmaşık sistemini temsil edecek bir hayvan modellemesi otizmdeki süreçleri anlamak ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (14).

5. HİPOKAMPUS

Hipokampus yapısal olarak limbik sistemin bir parçasıdır ve spasyal öğrenme, kısa süreli hafıza ve uzun süreli hafıza ile ilişkilidir. Hipokampus uzun süreli belleğe depolanacak bilgilerin kısa süreli bellek ile girdilerinin alınması ve sağlamlaştırılması sürecinde önemli bir rol oynar. Bunun yanı sıra çevreden gelen dış uyaranların algılanması, işlenmesi ve uygun tepki verilmesi gibi davranışların şekillenmesinde kritik bir düzenleyici görevi yapar (52). Duyu liflerinden aldığı bilgiler ile algılama ve depolama süreçlerinde bir köprü olan hipokampus, karmaşık iletişim ağı ile beynin birçok bölgesi ile etkileşim halindedir. Aldığı ve gönderdiği sinyaller ile duyuşsal bilgiler davranışa dönüştürülür. Bu nedenle işlevsel ve uygun davranışların ortaya çıkmasında hipokampusun rolü oldukça büyüktür. Buna ek olarak fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme analizleriyle bazı nöropsikiyatrik bozuklukların hipokampusu etkilediği gösterilmiştir. Örneğin depresyon veya travma sonrası stres bozukluğu hastalarında hipokampus hacminde azalma olduğu saptanmıştır. (53, 54).

5.1. Hipokampus Anatomisi

Hipokampus bir gri cevher tabakasıdır (55). İnsan beyninde ventralde bulunur, kemirgenlerde ise daha dorsaldedir. Histolojik kesitlerde C şeklinde eğik bir profile sahip olduğu görülür. Konkav kısmı hemisferin alt kısmı iken konveks olan kısım ise ventriküle bakmaktadır (56). Hipokampus üç bölümden oluşmaktadır: dentat girus (DG), subikulum ve Ammon Boynuzu. Ammon Boynuzu CA1, CA2, CA3 ve CA4 kısaltılarak adlandırılmıştır. CA1 hipokampusun en karmaşık ve subikuluma yakın olan bölgesidir. CA3 ise DG'ye yakın olarak bulunmaktadır ve en büyük boyuttaki piramidal nöronlar bu alandadır. CA2 ise CA1 ve CA3'ün arasında yer almaktadır ve piramidal nöronlar en yoğun olarak bu bölgedir (57). DG'nin görünümü V veya U şekline benzetilir ve bir trilaminant kortikal bölge olarak değerlendirilmektedir (58, 59). Subikulum ise çevresindeki neokorteks ile bittiği yere kadar 4-5 veya modifiye 6 tabakalı bir çeşitlilik gösterir (60).

5.2. Hipokampus Histolojisi

Mikroskopik düzeyde incelendiğinde hipokampus ventriküler yüzeyden derine toplam yedi adet tabakaya sahiptir (61).

1. Alveus: Ventriküle komşuluk yapmaktadır ve intraventriküler yüzeyi kaplamaktadır. Fornikse uzanan aksonların oluşturduğu tabakadır.
2. Stratum oriens: Piramidal nöronların bazal dentritleri ile internöronları içerir. Sınırları tam olarak belirli değildir.
3. Stratum pyramidalis: Mossy adı verilen liflerin sinaps yaptığı tabakadır. Büyük piramidal hücrelerin gövdelerini içerir. Piramidal hücrelerin bazal kısımları ilk katman olan alveuse doğru bakmaktadır.
4. Stratum lucidum: En ince tabakalardan biridir, motor tip piramidal hücreleri içerir.
5. Stratum radiatum: CA3'ten CA1'e projeksiyon yapan ve Schaffer olarak adlandırılan kollateralleri içerir. Piramidal hücrelerin apikal dendritlerden oluşmuştur.
6. Stratum lakünozum: Çok ince olan tabakalardan biridir ve Schaffer kolleteralleri içerir.
7. Stratum molekulare: En dışta kalan ve internöronlardan oluşan tabakadır (63-64).

Dentat girusun üç ayrı tabakası bulunmaktadır:

1. Granüler tabaka: Hücre çekirdekleri bu katmanda yer almaktadır.
2. Moleküler tabaka: Granüler hücrelerin dendritlerini içerir.
3. Polimorfik kısım: V veya U görünümünü veren şeklin iç kavis kısmıdır ve dentat hilus olarak da adlandırılır.

Polimorfik tabaka ve granüler tabaka arasında kalan alan subgranüler zon (SGZ) alanıdır ve otizmde etkilenen bölgelerden biridir (65).

5.3. Hipokampus Histogenezi

Hipokampusun piramidal ve granüler nöronlarının kök hücreleri CA1 bölgesinin üzerindeki ventriküler germinal tabakadan köken almaktadır. Sıçanların hipokampusunda bulunan CA1 ve CA3 piramidal nöronları 16. ve 21. embriyonik günler arasında oluşmaktadır. CA1 ve CA3 nöronlarının aynı segmentten köken alıp almadıkları ile ilgili henüz net bir bilgi bulunmamakla beraber Tole ve ark.larının farelerde yaptıkları bir çalışma ile CA1 ve CA3 bölgesinde farklı alan spesifik genetik belirteçleri tanımlanmış olmaları CA1 ve CA3 nöronlarının farklı segmentten köken almış oldukları fikrini desteklemektedir (66,58).

5.3.1. CA1 ve CA3 Piramidal Nöronlarının Göçü

Hipokampal CA1 bölgesindeki piramidal nöronların küçük bir kısmı Subventiküler Zon'da (SVZ) olmak üzere büyük oranda Ventiküler Zon'da (VZ) üretilirler ve buradan ayrılırlar VZ'nin üzerinde multipolar hücrelere dönüşerek İntermediate Zon (IZ)'ye doğru hareketlerini devam ettirirler. Hücrelerin oluşma günlerine göre Marjinal Zon (MAZ)'da bekleme süreleri değişmektedir. Embriyonik 12. günde ve 13. Günde oluşan hücreler bir gün multipolar olarak beklerler. E15 ve E16'da oluşan hücreler ise 3-4 gün kadar MAZ'de aynı formda kalmaya devam ederler. Embriyonik 14. 15. ve 16. günlerde oluşan CA1 piramidal nöronları bipolar bir yapıya dönüşerek IZ'a hareket ederler. İğsi bir yapıya sahip olan bu nöronlar hipokampal plakaya doğru göç ederler ve tekrar formlarını değiştirerek multipolar yapıya dönüşürler (67).

Sıçanlarda embriyonik 16. ve 20. günler CA3 nöronlarının VZ'de oluşmaya başladığı günlerdir ve zirveye ulaşmaları ise E17 ve E18 de gerçekleşir. VZ'de oluşuktan sonra MAZ'daki CA3 hücrelerinin yapıları multipolar forma dönüşür ve CA1 nöronları ile kıyaslandıklarında burada bekleme süreleri daha uzundur. 4 gün kadar MAZ'de bekleyen CA3 nöronları hipokampal plakaya göç ederler. CA2 bölgesindeki piramidal nöronların göçü hakkında elde edilen bilgiler sınırlıdır. Sıçanlarda Hipokampal plakanın U görünümünü alması E18 de başlar. Eğrilip, genişlemesi E21'e kadar devam eder. E22 de U şeklini alır (68).

İnsanda piramidal hücre tabakası erken evrelerde ortaya çıkar. CA1 ve CA3 tabakasının embriyonik 16. Hafta boyunca oluştuğu saptanmıştır. (58). Bu nedenle gebeliğin erken döneminde VPA ve TPP maruziyetinin yavruların hipokampusu üzerinde oluşturacağı etkinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

5.3.2. Dentat Girusun Granüler Hücre Tabakasının Oluşumu

Sıçanların dentat girusundaki granüler hücreler embriyonik 17.günde oluşurlar. E17. gün piramidal nöronların oluşumundan 1 gün sonraya denk gelmektedir. Sıçanların toplam granüler hücre sayısı göz önünde bulundurulduğunda %75 i doğumdan sonra oluşmaktadır. Bu nedenle piramidal nöronların oluşma süresiyle karşılaştırıldığında granüler hücrelerin oluşumunun daha uzun süreye yayıldığı görülmektedir ve yaşam boyu devam ettiği düşünülmektedir.

Ventriküler germinal tabakada oluşan granüler hücrelerin göçü buradan başlar ve hipokampuse doğru devam ederek CA3'ün uç kısmını çevreleyen dentat girusları

şekillendirir. Dentat granüler hücrelerin sınırları CA3 alanının ucu ve dentat girusun hilusudur. Büyük hiler nöronların oluşumu E15 ve E21 günleri arasında gerçekleşmektedir ve hemen hemen tüm hiler internöronlarının subkortikal orijinli olduğu belirlenmiştir. Hilusta postnatal hücre oluşum oranı telensefalonun periventriküler tabakasındakine benzerlik gösterdiğinden ötürü dentat hilus bölgesi, dentat girusun ikinci germinal tabakası olarak kabul edilmektedir. Kemirgenlerdeki hiler hücre sayısı doğumdan sonraki 10. Ve 25. günler arasında hızla düşüşe geçmektedir. Bu azalış hilusta oluşan hücrelerin granüler hücre katmanına doğru göç ettiklerini göstermektedir.

İnsanlarda granüler hücrelerin oluşması 13. embriyonik haftadan başlamaktadır (58). Gebeliğin erken döneminde çevresel bir ajana maruz kalmak, yavruların Ammon Boynuzundaki piramidal nöronların göçünü etkileyebileceği gibi dentat girusdaki hücreleri de etkileyebilir. Bu nedenle sıçanların embriyonik 12.5. gününde VPA ve TPP maruziyetinin sonuçları önem taşımaktadır.

6. OTİZMDE GÖRÜLEN YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER

Otizmde görülen davranış değişikliklerinin beynin tek bir bölgesi ile ilişkilendirilemeyeceği limbik sistem, talamus, beyincik gibi birçok beyin bölgesi ile ilgili olduğu öne sürülmektedir (69, 70).

Otizm üzerine yapılan genetik çalışmalar ve postmortem (ölüm sonrası) beyin görüntüleme sistemlerinin gelişmesiyle otizmin epilepsi, EEG anormallikleri, zeka geriliği gibi bozukluklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (71, 72).

Beyin görüntüleme sonuçlarına göre otizmlili bireylerin beyinlerinde yapısal bazı değişimler gözlenmiştir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile otizmlili bireylerde toplam beyin hacminin arttığı ve bu artışın da doğumdan sonraki bir yılda olduğu; en çok temporal, frontal lobta ve amigdalada değişim olduğu gösterilmiştir ve beyin yapısındaki bu değişimlerin otizme neden olabileceği düşünülmektedir (73-75).

Bu doğrultuda, fonksiyonel MRG’de ise yüz tanıma testlerinde temporal lobun fusiform girus bölgesindeki etkinliğin azaldığı; sosyal etkileşimler sırasında da amigdalada aktivasyonun düştüğü bulunmuştur (76).

Yapılan çalışmalarda otizmin ortaya çıkmasının gebelikte nöral tüpün kapanmasına denk geldiği ve doğum sonrası faktörlerin de ortaya çıkmasını tetiklediği üzerine yoğunlaşmıştır (77).

Hipokampustaki değişiklikler ve anormallikler hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır (28).

6.1. Hipokampus ve Otizm

Otizmde görülen yapısal değişikliklerin yoğun olduğu bölgelerden biri de hipokampus bölgesidir (78). Otizmlilerin gelişimsel bozukluklarına eşlik eden, davranışlarında görülen problemler bu değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (79). Laboratuvar hayvanlarında oluşturulan otizm modellerinde de hipokampus alanında nöron kaybı kaydedilmiştir ve buna bağlı olarak da öğrenme becerilerinde bozukluklar görülmüştür (80). Yapılan postmortem çalışmalarda ise hipokampusun CA1, CA4 ve subikulumda bulunan nöronların hücre gövdelerinin daha küçük ve dendritik dallanmalarının da daha az olduğu görülmüştür (81). Bu bilgilerin yanısıra MRG çalışmalarından elde edilen bulgulara göre ergenlik dönemindeki otizmlili bireylerde çocukluk çağından itibaren, emosyonel süreçlerin

merkezi olduğu bilinen hipokampus ve amigdalada anatomik değişiklikler kaydedilmiştir (82).

Otizmin ortaya çıkmasında embriyonik gelişim sürecinde maruz kalınan kimyasallarında etkisi oldukça önemlidir. Hipokampusun embriyonik 12,5 gündeki olgunlaşma süreci maternal uygulanan VPA'nın sıçanlarda otizm ve benzeri davranışların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nöronların yüksek orandaki aktivasyonu ve plastisitesi sinaptik iletinin dengesizliğine neden olur ve bu dengesizlik de otizmlili beynin karakteristik özelliğini oluşturmaktadır. (83). Embriyonik 12,5 günde VPA ile indüklenen otizmlili hayvan beyinlerinde sinaptik iletişimin hasarlı olduğu ve GABAerjik sinapsların bozulmasından kaynaklandığı düşünülen sosyal etkileşim eksiklikleri ve streotipik/tekrarlayıcı davranışlar görölmektedir (85). Aynı zamanda VPA modeli internöronların hasarını, hipokampus granüler hücreleri başta olmak üzere SGZ hücre proliferasyonunu ve plastisitesini yetişkinlik dönemine kadar büyük oranda etkileyerek geç nörojeneze neden olmaktadır (85).

Tüm bu bilgilerin ışığında embriyonik dönemde VPA'ya maruz kalan sıçanların ergenlik dönemlerindeki hipokampal sinaptagonez, nörojenez ve davranışsal değişiklikleri büyük önem taşımaktadır.

7. GEREÇ VE YÖNTEM

7.1. Deneysel Materyaller

9 adet Wistar Albino Türü Gebe Dişi Sıçan ve 30 adet erkek yavru sıçan

Deney kafesi

Hassas Terazî

Serum Fizyolojik

Enjektör

Lam-Lamel

Anestezik maddeler (Ketamin, Ksilazin)

Heparin

Flaster

Kanül

Formaldehit (%10)

Etil Alkol

Parafin

Ksilol

Entellan

Parafilm

Fosfat Tamponu

Kakodilat Tamponu

Eozin, Hematoksilen, Toluidin Blue, Giemsa Boya Solüsyonları

Cresyl Violet, Luxol Fast Blue Boya Solüsyonları

Serum Seti

Distile Su

Falkon Tüpler

Serum Şişesi

Depakin

Trifenil Fosfit

Cerrahi Setler

Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi

Mısır Koçanı Türü Talaş ve Standart Cam Bilye

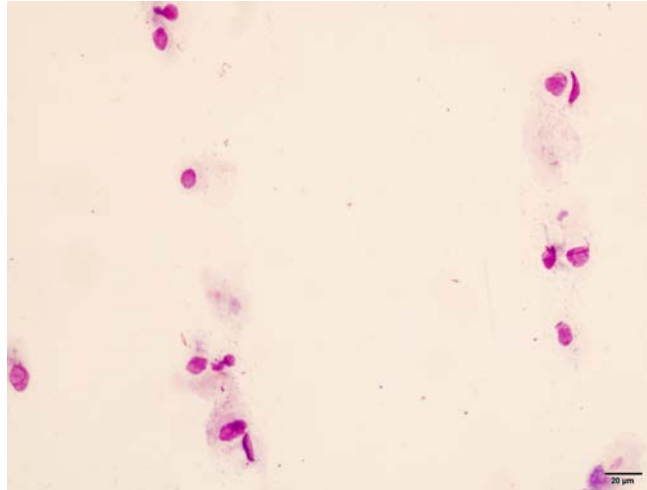
Tripot

Kamera

7.2. Yöntem

Çalışma Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik kurulu 2017-081 sayılı onayıyla başlatılmıştır. Çalışma süresince etik kurallara bağlı kalınmıştır. Çalışmanın deneysel kısmı Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, histolojik kısmı ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılacak 9 adet gebe Wistar Albino türü sıçan Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Gebelik süresince ve yavruların sakrifiye edilmesine kadar geçen süreçte ($p=35$) deney hayvanlarının bakımları 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde, 22 ± 2 °C; $50\pm 10\%$ nem oranında, yiyecek ve suya serbest erişim sağlanacak şekilde yine aynı merkezde sağlanmıştır.

Estrus döngülerinin belirlenmesi amacıyla Wistar Albino türü dişi sıçanların vajinal smearleri alınmıştır. Alınan smearler alkol ile tespit edilip lama yaydırılarak %5lik Giemsa Yayma Preparat Boyası ile boyanmıştır. Işık mikroskopunda yapılan inceleme ile proestrus döneminde olan dişi sıçanlar 3 dişiye 1 erkek olacak şekilde bir gece boyunca çiftleştirmeye bırakılmış ertesi sabah vajinal plak gözlenen sıçanlar gebe olarak kabul edilmiş, ayrı kafeslere alınmıştır ve embriyonal 1. gün (E1) olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1: Proestrus Dönemi

7.2.1. Araştırmada Kullanılan Deney Grupları

- ✓ Grup 1: VPA uygulanan 3 adet gebe sıçan (500 mg/kg) ve erkek yavruları (n=10)
- ✓ Grup 2: TPP uygulanan 3 adet gebe sıçan (100 mg/kg) ve erkek yavruları (n=10)
- ✓ Grup 3: Serum fizyolojik uygulanan 3 adet gebe sıçan (eşit dozda) ve erkek yavruları (n=10)



şekil 2: Gebe Sıçanlar

7.2.2. Kullanılan Maddeler

7.2.2.1. Depakin (VPA)

Embriyonik gelişimin 12.5 gününde gebe sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edilecek Valproik asit dozu literatür taramasına göre 500 mg/kg olarak belirlenmiştir (37). DEPAKİN® olarak temin edilen kimyasal 200 mg/ml oranında çözelti olarak hazırlanmıştır.

7.2.2.2. Trifenil Fosfit

Gebelikte valproik asit ile indüklenen davranışsal ve yapısal farklılıkların sonuçları karşılaştırılmak üzere Trifenil Fosfitin enjeksiyon günü de embriyonik gelişimin 12.5 günü olarak belirlenmiştir. Verilecek doz ayarında ise Levin ve ark. yaptığı çalışma esas alınmış, toksik olmayan 250 mg/kg olarak belirlenmiştir (48).

Maddenin ciltte oluşturabileceği hasarı engellemek amacıyla likit formdaki TPP, propilen glikol (1 ml/kg) aracılığıyla ve enjeksiyon şiddetini eşitlemek amacıyla serum fizyolojik eklenerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır. TPP uygulamasından 4 gün sonra 2 gebe sıçanın ölmesi ile 3. gebe sıçana 1.5 mg/kg dozunda iki kez atropin uygulanmıştır (51). Bu grup deney dışı bırakılmıştır. Toksik olmayan doz olarak belirlenen 250 mg/kg gebe sıçanlar için öldürücü olduğu görüldüğünden doz azaltmaya gidilerek 100 mg/kg çekilmiş ve yeni bir doz denemesinde bulunulmuştur. Bu doz gebe sıçanların doğuma kadar kilolarında herhangi bir farklılığa neden olmamış ve doğumlar 21 ve 22. günlerde gerçekleşmiştir.

7.2.2.3. Serum Fizyolojik

Enjeksiyondan kaynaklanabilecek stresi elimine etmek amacıyla kontrol grubu olarak belirlenen 3 adet gebe sıçana E12.5 'ta VPA ve TPP ile eşit dozda serum fizyolojik uygulanmıştır.

Doğumu gerçekleşen sıçanlar süttten kesilene kadar anne ile aynı kafeste tutulmuştur (P23). Süttten kesilen sıçanlar uygun kafesleme ile cinsiyetlerine göre ayrılmıştır.



Şekil 3: Yenidoğan Sıçanlar

7.3. Davranış Testleri

Yavru sıçanlar dişi erkek olarak ayrıldıktan sonra P33 ve P34'te davranış deneylerine alınmak üzere 5 gün boyunca handling uygulanmıştır. Davranış testleri sabah 09:00 ile öğleden sonra 4:00 arasında yapılmıştır. P33 ve P34 günlerde Bilye

Gömme ve 3 Odacıklı Sosyal Etkileşim Testleri öncelik sonralık etkisini ortadan kaldıracak şekilde eşitlenerek gerçekleştirilmiş ve skorlanmıştır.

7.3.1. Bilye Gömme Testi

Çalışmamızda kullanılan protokol, Wayne State University Kurumsal Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmıştır (85). Test ekipmanları laboratuvar şartlarımıza göre düzenlenerek sıçanlara uygulanmıştır.

7.3.1.2. Protokol

1. Kapak takılı standart polikarbonat kafesler kullanılmıştır (20x33x55).
 - i. Her kafese 5 cm derinliğinde kokusuz ve daha önce kullanılmamış taneler şeklinde talaş eklenmiş ve düzeltilmiştir
2. Standart cam bilyeler 5x4 olacak şekilde her bir kafes için toplam 20 adet olarak talaşların üzerine dizilmiştir (Her bir kullanımdan önce bilyeler önce deterjan sonra da distile su ile yıkanarak temizlenmiştir).



Şekil 4: Bilye Gömme Testi

7.3.1.2.1. Testin Yapılışı

Test başlangıcından 1 saat önce sıçanlar deney odasına getirilmiştir.

1. Sıçan bilyelerin ve talaş yatağının düzenini bozmayacak şekilde kafesin köşesinden bırakılmıştır ve kafesin kapağı takılmıştır. Test 30 dakika sürmüştür ve bu süre boyunca hayvanlara yem ve su verilmemiştir.



Şekil 5: Bilye Gömme Testinin Yapılışı

2. Test süresi (30 dk) bittikten sonra sıçan yine talaş ve bilyelerin son halini bozmayacak şekilde kafesten çıkarılmıştır.
3. Test sonu değerlendirmesi için deney hakkında bilgisi olmayan 3 kişinin ayrı ayrı skorlamaları not edilmiştir (Her bir bilyenin 2/3'ü talaşla örtülü ise gömülü olarak kaydedilmiştir).
 - ✓ 3 ayrı skorlayıcının kaydedilen değerlendirmelerinin ortalaması alınmış ve her bir sıçan için sonuç skoru belirlenmiştir.

7.3.2. Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi

Sıçanların Sosyal Yenilik/Tercihini değerlendirmek amacıyla Crawley'in Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi Kullanılmıştır (86). Test materyalleri laboratuvar koşullarımıza göre düzenlenmiş, uygulanmış ve sıçanların odacıklarda bulunma süresi kaydedilmiştir.

Crawley'in sosyal etkileşim testi üç odacıklı dikdörtgen bir kutu ile gerçekleştirilir. Orta bölmede diğer iki bölmeye giriş çıkışı sağlayacak bir açıklık bulunmaktadır. Sağ ve sol bölmelerde deney sıçanının sosyal yeniliğini değerlendirmek amacıyla deney sıçanının özelliklerine sahip (aynı cinsiyet, benzer kilo ve yaş), daha önce deney sıçanı ile temas etmemiş yabancı iki adet sıçan daha kullanılmıştır. Yabancı sıçanların odacık dışına çıkmamaları için beyaz, sıçanların

birbirlerini görebilecekleri fakat fiziksel olarak temasta bulunmalarına olanak vermeyen her bir odacığa birer adet sepet yerleştirilmiştir.



Şekil 6: Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi

Test alıştırma ve sonrasında iki aşamadan oluşmaktadır:

✓ **Alıştırma Aşaması**

Sıçan iki odacığa erişimi engellenerek orta bölmeye 5 dakika süreyle alışması için bırakılır.

✓ **İkinci Aşama**

Birinci yabancı sıçan sağ ve sol bölmelerden birine (sistemik olarak değiştirilmiştir) yerleştirilmiştir ve orta bölme açılarak sıçanın üç odacığı gezinmesine olanak tanınmıştır. 10 dakika süresinde sıçan izlenmiş ve üç odacıkta geçirdiği süreler kaydedilmiştir.

✓ **Üçüncü Aşama:**

Üçüncü aşamada ise boş kalan sepete ikinci yabancı hayvan yerleştirilmiştir. 10 dakika süresince sıçanın odacıklarda bulunma süreleri kaydedilmiştir ve test sonlandırılmıştır.

Her bir deney sıçanı için 3 aşama ile birlikte bir test toplam 25 dakika sürmüştür. Test sonlandırıldıktan sonra %70 etanol ile temizlenmiş ve sonrasında dezenfektan ile silinmiştir.

7.4. Deneyin Sonlandırılması ve Histolojik Takip

P=35'te perfüzyon ile beyin dokusu histolojik takip için alınmıştır.

7.4.1. Kullanılan Tamponlar

Fosfat Tamponu (PBS)

2,56 g NaH₂PO₄.H₂O

8 gr NaCl

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄

1000 cc distile su

Kakodilat Tamponu

1,38 gr Cacodylic Acid

100 cc distile su

Formaldehit (%4lük)

40 cc formaldehit (%10lük)

60 cc distile su

Kakodilat Tamponu+Formaldehit

0,1 M 50 cc Kakodilat Tamponu+%4lük 50 cc formaldehit

7.4.2. Perfüzyon

Perfüzyon için hazırlanmış Fosfat Tamponunda %4lük Formaldehit ile doğum sonrası 35. gününde olan sıçanlar perfüze edilmiştir.

1. Ketamin (80-100 mg/kg), Ksilazin (10-12.5 mg/kg) ve Heparin beraber insülin enjektörüne çekilmiş ve enjeksiyon yapılarak sıçanlar anestezi altına alınmıştır.
2. Anestezi altına alındıktan sonra deri, derialtı, fascia ve processus xphoideus kaldırılmıştır.
3. Diafragma disseke edilerek toraksa ulaşılmış ve kalbin sol ventriküle kanül ile girilmiştir.
4. Sıçanların dolaşımına hazırlanan fiksatif girmiş ve perfüze edilmeye başlanmıştır.
5. Birkaç saniye sonra sağ atrium delinerek kanın dışarı çıkması sağlanmıştır.



Şekil 7: Perfüzyon



Şekil 8: Perfüzyon sonrası beyin

Yeterli süre sonra beyinler histolojik takip için hazırlanan fiksatifin içine konmuş ve aşağıda sıralanan şekilde takip aşamasına gelinmiştir:

1. Dokular 3 gün boyunca her gün değiştirilmek üzere aynı fiksatifte kalmıştır.
2. Dokular dördüncü gün yıkanmak ve disseke edilmek üzere PBS' e alınmıştır.
3. Disseksiyon ile beyin serebellum ve ön kısmı ayrılarak arka kısmı hipokampus için disseke edilmiştir.



Şekil 9: Disseksiyon Mikroskop Görüntüsü

4. Disseke edilen beyinler 0,1 M Kakodilat Tamponu ve Formalin karışımına alınmış, bir gün boyunca bekletilmiştir.
5. Formalin ve Kakodilat tamponu karışımından alınan dokular bir gün boyunca 0,1 M Kakodilat tamponunda bekletilmiş, ertesi gün takibe alınmıştır.

7.4.3. Takip ve Parafine Gömme

%80 Alkol = 1 saat

%95 Alkol= 1 saat

%100 Alkol= 1 saat

%100 Alkol= 1 saat

%100 Alkol= 40 dk

Alkolden alınan dokular kuruyuncaya kadar bekletildi ve sonra ksilolde şeffaflamaya alındılar. 30 dk Parafin I'de 30 dk Parafin II'de 58-60°C'de bekletildikten sonra parafine gömülerek bloklar elde edildi.



Şekil 10: Takip Sonrası Beyin

7.4.4. Mikrotom ile Kesit Alma

Mikroskop altında yapısal değişiklikleri gözlemek amacıyla mikrotomda (Leica RM 2145) parafin bloklardan 5µ'luk kesitler alınmıştır. Kesitlerin 36°C'lik su banyosunda açılması beklenmiş ve polilizinli lamalar üzerine alınmıştır.

Lamlar 1 saat boyunca etüvde ve 1 gece boyunca ksilolde bekletilmiştir, ertesi güne histokimyasal boyamalar için hazırlanmıştır.

7.5. Histokimyasal Boyalar

7.5.1. Hematoksilen ve Eosin

Bir gece boyunca ksilolde bekletilen preparatlar kurutulduktan sonra aşağıdaki aşamalardan geçmiştir:

%100 Alkol 4 dk boyunca bekletildi

% 95 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

% 80 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

Distile su 4 dk boyunca bekletildi

Hematoksilen 5 dk bekletildi

Akarsuda yıkandı

Asit Alkol (pembe renk olana kadar)

Akarsuda yıkandı

Amonyaklı suya daldırılıp çıkarıldı (2-3 kez mor renk olana kadar)

Akarsuda yıkandı

Distile suda 5 dakika boyunca yıkandı

Eozin'de 1.40 saniye bekletildi

%95 Alkol 2-3 kez daldırılıp çıkarıldı

%100 Alkol 2-3 kez daldırılıp çıkarıldı.

Boyanmış preparatlar kurutulmaya bırakıldı, kuruduktan sonra 15-20 dk ksilolde bekletildi ve sonrasında entellan ile kapatıldı.

Boyama Sonucu: Çekirdek: Mavi olarak görünür.

Sitoplazma: Pembe olarak görünür.

7.5.2. Toluidin Blue

Bir gece boyunca ksilolde bekletilen preparatlar kurutulduktan sonra aşağıdaki aşamalardan geçmiştir:

%100 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

% 95 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

% 80 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

Distile suda yıkandı

Toluidin Blue solüsyonunda 15 dk boyunca bekletildi.

%95 Alkol 1-2 kez daldırılıp çıkarıldı

%100 Alkol 1-2 kez daldırılıp çıkarıldı.

Boyanmış preparatlar kurutulmaya bırakıldı, kuruduktan sonra 15-20 dk ksilolde bekletildi ve sonrasında entellan ile kapatıldı.

Boyama Sonuçları:

Sinir hücreleri için;

Çekirdekler: Açık mavi

Nissl cisimcikleri: Koyu mavi

Glia hücreleri için;

Astrositler: Açık mavi

Oligodendroglialar: Koyu mavi

7.5.3. Giemsa Boyası

Kurutulmuş kesitler 10 dakika boyunca Metanolde bekletildi.

Distile suda yıkandı

Giemsa solüsyonunda 33 dk. boyunca bekletildi.

Akarsu da yıkandı ve entellan ile kapatıldı.

Sonuçlar:

Çekirdek: Mavi-mor arası

Sitoplazma: Açık mavi tonlarda

Eritrositler: Sarımsı ya da grimsi pembe tonlarda

7.5.4. Mallory & Azan

%100 Alkolde 4 dk. bekletildi

%95 Alkolde 4 dk. bekletildi

Akarsuda yıkandı.

Asit fuksin'de 4 dk boyunca bekletildi.

Anilin-blue solüsyonunda 30 dk. boyunca bekletildi.

Akarsuda yıkandı.

%95 alkole batırılıp çıkarıldı

%100 alkole batırılıp çıkarılarak kuruduktan sonra ksilole alındı 15 dk. bekledi ve entellan ile kapatıldı.

7.5.5. Luxol Fast Blue&Cresyl Violet Boyası

Ksiolde deparafinize edilen preparatlar kurutulduktan sonra aşağıdaki aşamalardan geçmiştir:

%100 alkolde 2 dakika bekletildi.

%95 alkolde 2 dakila bekletildi.

Luxol Fast Blue solüsyonunda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi

Ertesi gün %95 alkole batırılıp, çıkarıldı.

Distile suda yıkandı.

%0,05 lityum karbonatta 20 saniye tutuldu.

%70 alkole batırılıp çıkarıldı.

%0,1 'lik Cresyl Echt Violet solüsyonunda 30 dk bekletildi.

%95 alkole batırılıp çıkarıldı.

%100 alkole batırılıp çıkarıldı.

Ksilolde 15 dk bekletildi.

Entellan ile kapatıldı.

7.5.6. Cresyl Violet Boyası

Bir gece boyunca ksilolde bekletilen preparatlar kurutulduktan sonra aşağıdaki aşamalardan geçmiştir:

%100 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

% 95 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

% 80 Alkol 2 dk boyunca bekletildi

Distile suda yıkandı

Toluidin Blue solüsyonunda 30 dk boyunca bekletildi.

%95 Alkol 1-2 kez daldırılıp çıkarıldı

%100 Alkol 1-2 kez daldırılıp çıkarıldı.

Boyanmış preparatlar kurutulmaya bırakıldı, kuruduktan sonra 15-20 dk ksilolde bekletildi ve sonrasında entellan ile kapatıldı.

8. İSTATİSTİK

Davranış testleri olan Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi ve Bilye Gömme test skorlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılmıştır. Bilye Gömme ve Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testleri için hesaplamalar yapılmış, Kruskal-Wallis Test ve Mann-Whitney Testleri kullanılmıştır.

9. BULGULAR

9.1. Bilye Gömme Testi

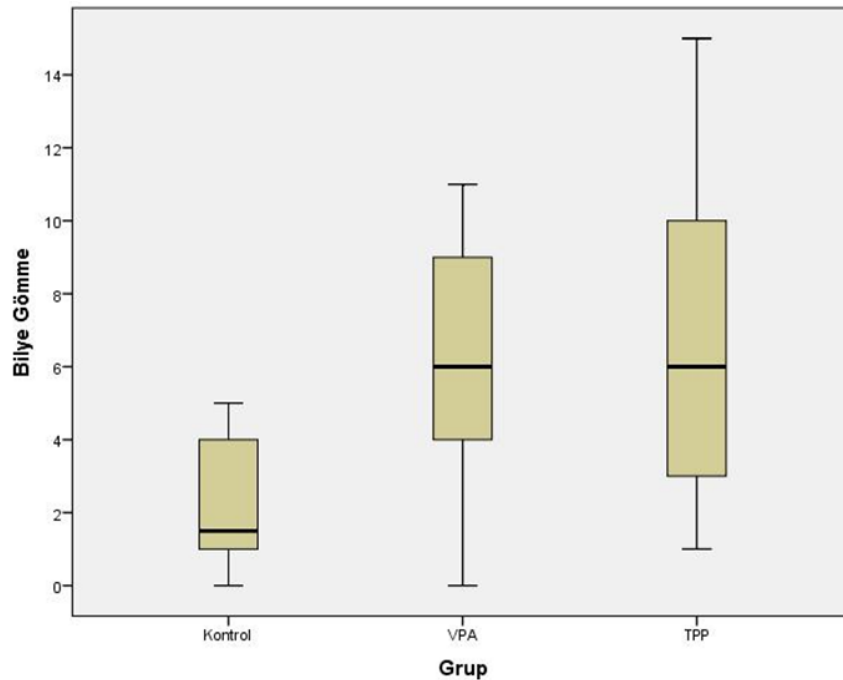
Bilye Gömme testi otizmdeki tekrar edici davranışları ölçmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubu ile VPA grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. VPA grubu tipik bir otizm benzeri davranış sergilemiştir ($p=0.012$, $p<0.05$).

Kontrol Grubu ve TPP grubu istatistiksel olarak kıyaslandığında TPP'nin tekrar edici davranışlarının farkı anlamlıdır. ($p=0.037$, $p<0.05$)

VPA ve TPP grubu birbiri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ve benzer şekilde tekrarlayıcı davranış göstermişlerdir ($p=0.879$, $p>0.05$).

İstatistiksel veriler üç grup beraber değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla VPA ve TPP grubunun benzer şekilde tekrarlayıcı davranışlar gösterdiği saptanmıştır.



Tablo 1: Gruplara Bilye Gömme Testi Sonuçları

9.2. Sosyal Etkileşim Testi

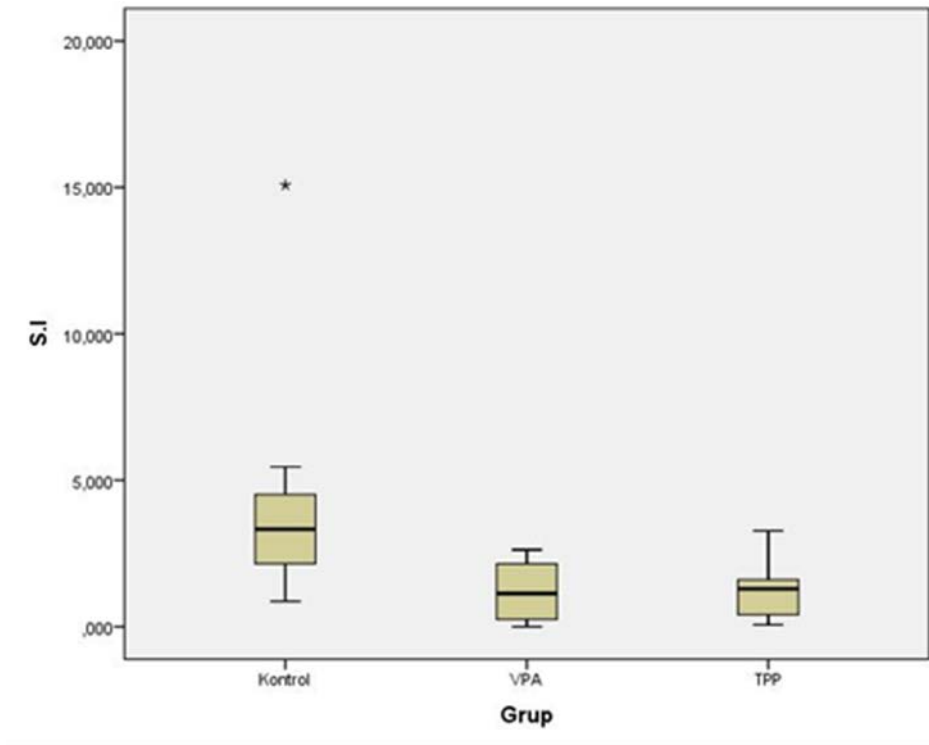
Sosyal etkileşim testi otizmde görülen sosyal iletişim bozukluklarını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Birinci aşamada sosyal etkileşim için SI kodlaması kullanılmıştır ve şu şekilde hesaplanmıştır: Birinci Yabancı Hayvanın yanında geçirdiği süre/Boş alanda geçirdiği süre

VPA grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında SI skorunda anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.009$, $p<0.05$). VPA grubu boş alanda daha fazla süre geçirmiştir.

TPP grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında SI skorunda anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.009$, $p<0.05$). TPP grubu testin birinci aşamasında boş alanda daha fazla süre geçirmiştir.

TPP ve VPA grubu birbiri ile kıyaslandığında SI skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.895$, $p>0.05$). TPP ve VPA grubu otizm ve benzeri davranışları göstermişlerdir.



Tablo 2: Gruplara göre Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi SI skorları

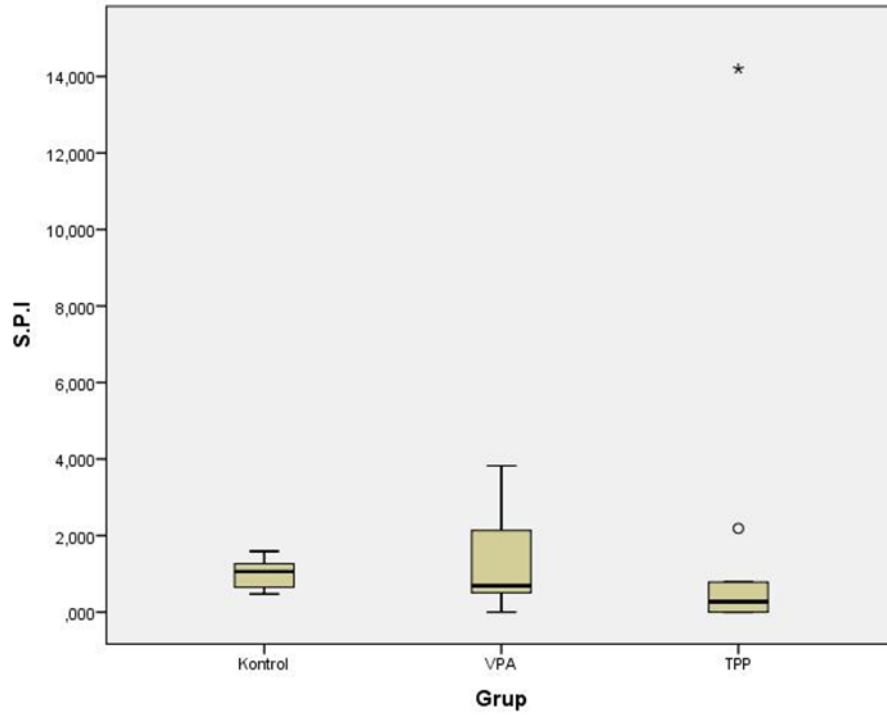
Sosyal Etkileşim Testinin ikinci aşamasında denek hayvanının İkinci yabancı hayvanın yanında geçirdiği süre, ikinci aşamada birinci yabancı hayvanın yanında geçirdiği süreye göre hesaplanmıştır. SPI kodu kullanılmıştır ve formülü şu

şekildedir: İkinci yabancı hayvanın yanında geçirdiği süre/Birinci yabancı hayvanın yanında geçirdiği süre.

VPA grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak SPI’da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,288$, $p>0.05$).

Kontrol grubu ile TPP grubu kıyaslandığında SPI skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ve TPP grubunun sosyal yenilik tercihinde bozulmalar olduğu görülmüştür ($p=0.005$, $p<0.05$)

VPA grubu ile TPP grubunun SPI skorları arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur ve TPP grubunun sosyal etkileşiminin VPA’ya kıyasla daha fazla bozulduğu görülmüştür ($p=0.048$, $p<0.05$).

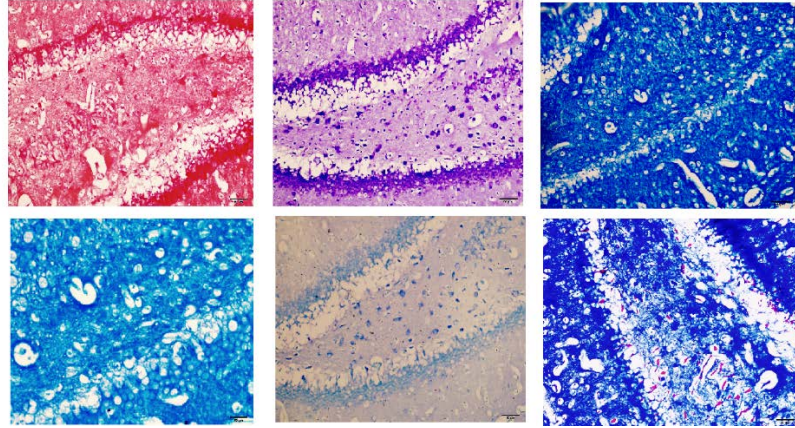


Tablo 3: Gruplara göre Sosyal Etkileşim Testi SPI skorları

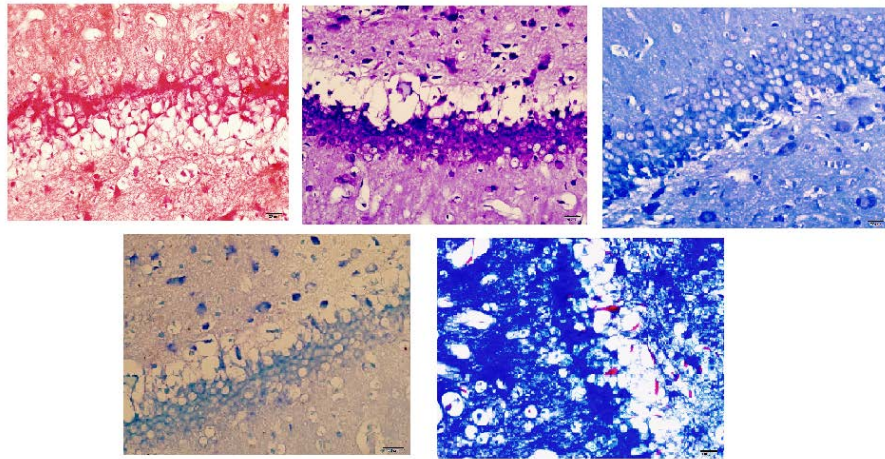
9.3. Hipokampal Değişiklikler

Maternal 12.5 günde intraperitoneal enjeksiyon ile serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunun hipokampal görüntülemesi için histokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır. Hematoksilen-Eozin (HE), Cresyl Violet (CV), Toluidin Blue (TB), Mallory Azan (MA), Luxol Fast Blue&Cresyl Violet (LB&CV), boyamaları ile elde edilen görüntülere göre SGZ’deki hücreler normal dağılım göstermiş ve büyüklükleri normal izlenmiştir. SGZ’nin P35’te aktif olduğu ve gelişimin devam ettiği

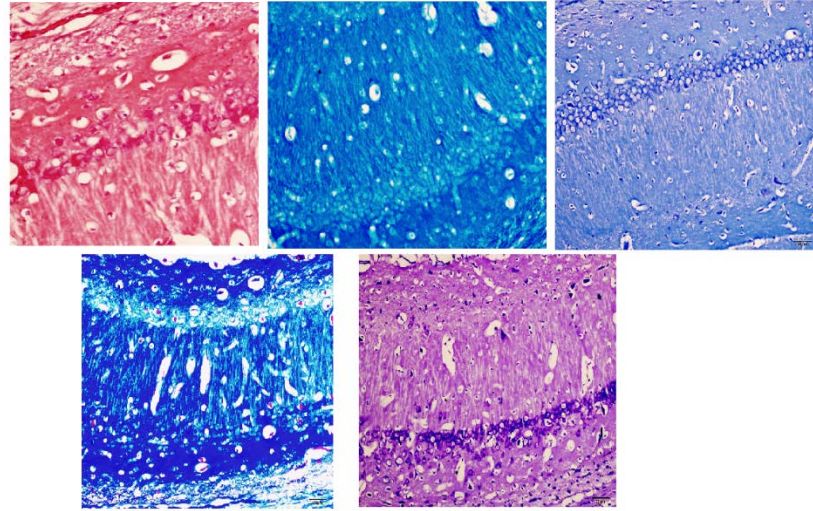
saptanmıştır. DG hücrelerinde göç hatası kaydedilmemiş ve normal bir yapısal dağılım göstermiştir. Hipokampusun CA4, CA3, CA2 ve CA1 bölgeleri de DG ve SGZ gibi normal bir dağılım göstermiştir. Schaffer kollektaralleri ve fimbrialar normal izlenmiştir.



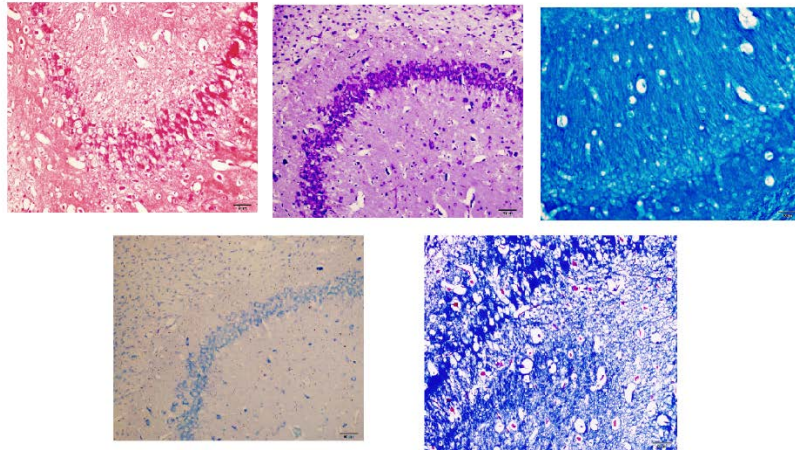
Şekil 11: Kontrol Grubu DG Görünümü Boyalar Sırasıyla: HE (20x), CV (20x), LB&CV (20x), LB&CV (40x), TB (20x), MA (40x)



Şekil 12: Kontrol Grubu SGZ 40x Görüntüleri Boyaları Sırasıyla: HE, CV, LB&CV, TB, MA



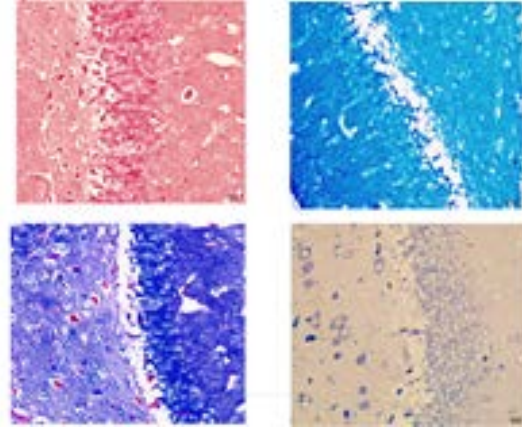
Şekil 13: Kontrol Grubu CA1-CA2 ve Katmanların 20x Görüntüleri Boyaları Sırasıyla: HE, LB&CV, TB, MA, CV



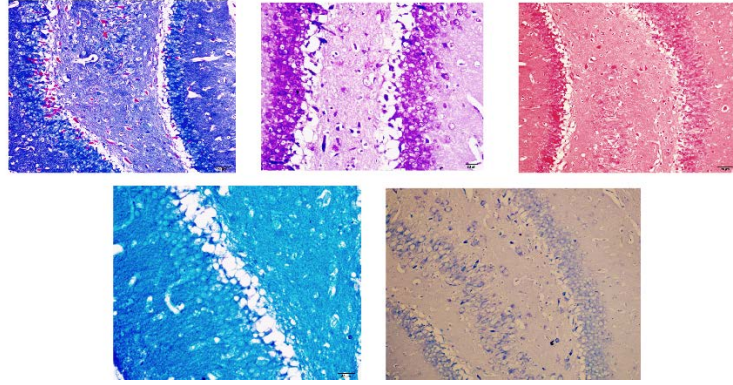
Şekil 14: Kontrol Grubu CA3 20X Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, CV, LB&CV, TB, MA

Maternal 12.5 günde intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanan VPA'nın yavruların hipokampal yapısında oluşturduğu değişiklikler HE, CV, TB, MA, LB&CV boyamaları yapılarak histokimyasal olarak incelenmiştir.

Histokimyasal boyamalar ile yapılan değerlendirmelere göre VPA grubunun SGZ'sinde kontrol grubuna kıyasla belirgin boşluklar saptanmıştır. SGZ'de küçük nukleuslar olduğu görülmüş ve SGZ'nin P35'te de aktif formda olduğu, henüz gelişimini tamamlamadığı belirlenmiştir. DG'de ise hücre sayısında artış ve katmanın genişlediği görülmüştür (moleküler katman). DG'de granüler hücrelerine çok yakın konumda oldukça belirgin piramidal nöronlar görülmüştür.

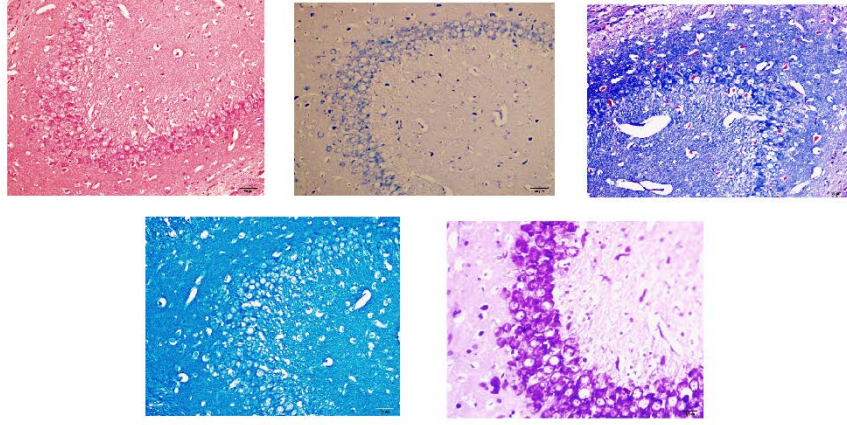


Şekil 15: VPA Grubu 40x SGZ Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, LB&CV, MA, TB

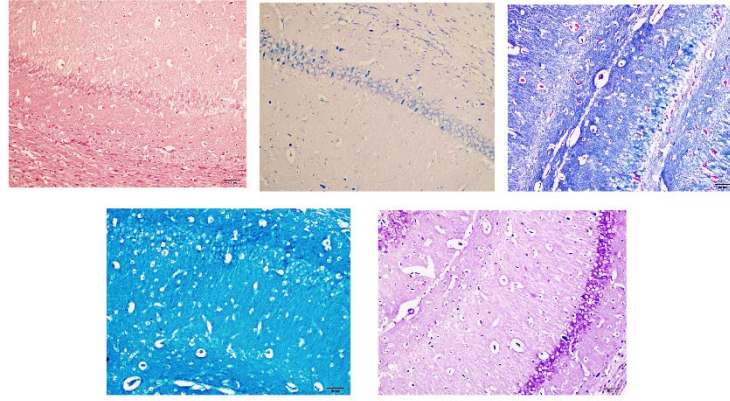


Şekil 16: VPA grubu DG Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: MA (20x), CV (20x), HE (20x), TB&CV (40x), TB (20x)

VPA grubunun CA4 bölgesindeki hücrelerin dağınık yerleştiği ve kapladığı alanın arttığı saptanmıştır. CA3 alanında ise Schaffer kollektaralleri oldukça belirgindir. Nöron yoğunluğunda ise azalma kaydedilmiştir. CA2 ve CA1 bölgelerinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında katman sayısında ve piramidal nöronlarda azalma saptanmıştır.



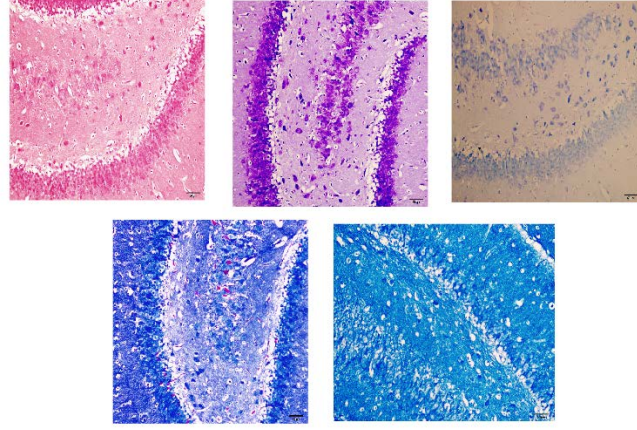
Şekil 17: VPA grubu CA3 20x Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, TB, MA, TB&CV, CV



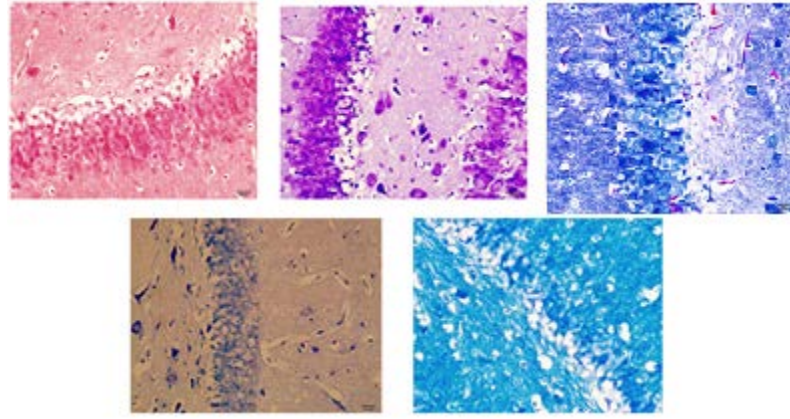
Şekil 18: VPA Grubu CA2-CA1 ve Katmanların 20x Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, TB, MA, LB&CV, CV

Maternal 12.5 günde intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanan TPP'nin yavruların hipokampal yapısında oluşturduğu değişiklikler HE, CV, TB, Mallory Azan, Luxol Fast Blue&Cresyl Violet, boyamaları yapılarak histokimyasal olarak incelenmiştir.

Histokimyasal boyamalar ile yapılan değerlendirmelerde SGZ'da vakualizasyon tespit edilmiştir. DG'un ise kontrol grubuna kıyasla kapladığı alan artmıştır. Granüler hücrelerin bulunduğu alanda yoğun şekilde piramidal nöronlar saptanmıştır ve göç hatası olarak değerlendirilmiştir.

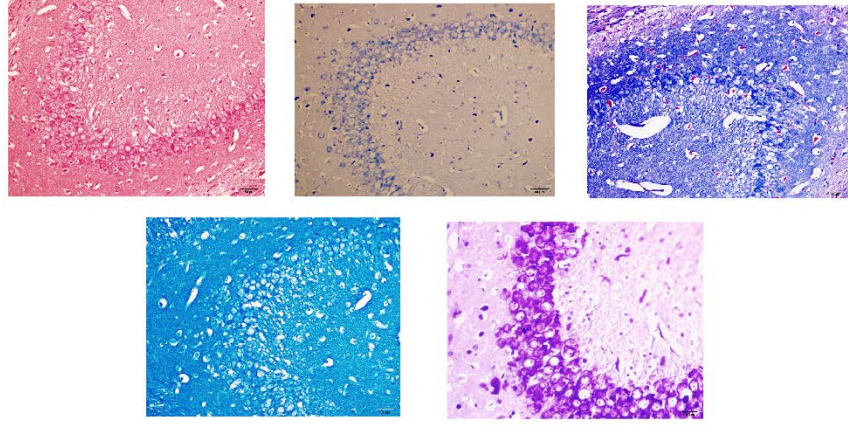


Şekil 19: TPP grubu DG 20x Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, CV, TB, MA, LB&CV

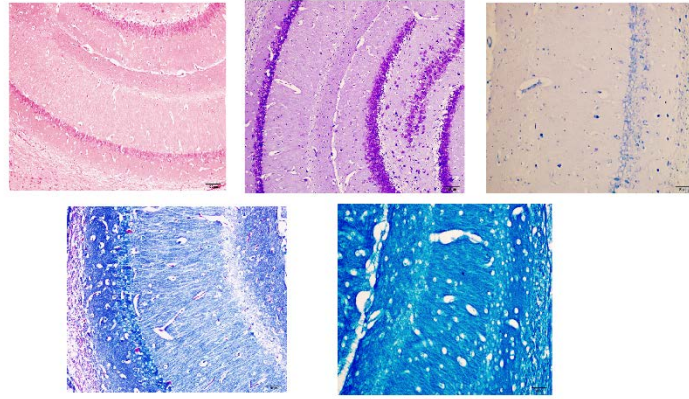


Şekil 20: TPP grubu SGZ 40x Görüntüleri Boyamaları Sırasıyla: HE, CV, MA, TB, LB&CV

TPP grubunun CA4, CA3, CA2 ve CA1 bölgeleri VPA grubuna göre kontrol grubuna daha yakın görünümündedir. Schaffer kollektaralleri, fimbria, oligodendrioglialar ve damar genişlikleri normal izlenmiştir. Radiatum ve alveus katmanlarının kontrol grubuna kıyasla genişlediği kaydedilmiştir.



Şekil 21: TPP Grubu CA3 görüntüleri boyamaları sırasıyla: HE (20x), TB (20x), MA (20x), LB&CV (20x), CV (40x)



Şekil 22: TPP Grubu CA2-CA1 ve Katmanların 20x Görüntüsü
Boyamaları Sırasıyla: HE, CV, TB, MA, LB&CV

10. TARTIŞMA

Otizm sosyal etkileşimdeki bozukluklar ve tekrarlayıcı davranışlarla kendini gösteren nörogelişimsel bir spektrum bozukluğudur (87).

Nörogelişimsel bozuklukların ortaya çıkmasında çevresel etkenler üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler oldukça önemlidir. Bu çalışmada bu açıdan TPP ve VPA'nın etkileri araştırılmıştır.

Codagnone ve ark. yaptıkları çalışmada VPA'nın DG'deki granüler katman sınırlarının ve CA3'ün normale göre daha dağınık, nöronların piramidal tabakanın dışına yerleştiklerini göstermişlerdir (88). Yaptığımız histokimyasal boyama sonuçlarına göre VPA grubunda DG ve CA3'te dağılmış sınırlar görülerek literatürle uyumlu sonuçlar saptanmıştır. Wu ve ark. yaptıkları çalışmada VPA'lı grubun hipokampal CA1 bölgesindeki nöronların diziliminde aralıklar, hücrelerin sınırlarında belirsizlikler, hasarlı nöronlar görüntülenmiştir (89). Bizim yaptığımız histokimyasal boyama sonuçlarına göre CA1 bölgesindeki hücrelerin sınırlarında düzensizlikler tespit edilmekle beraber katman sayısında azalma olduğu bulunmuştur. Watanabe ve ark.larının yaptıkları çalışmada SGZ hücre proliferasyonunda farklılıklar saptanmış ve nörogenezin etkilendiği gösterilmiştir (85). Çalışmamızdan elde ettiğimiz SGZ bulgularına göre gelişimin devam ettiği gösterilmiş ve küçük nukleuslar ile vakuolizasyon saptanmıştır. Literatürdeki sonuçlara ek olarak CA4 bölgesindeki hücrelerin dağınık ve kapladığı alanın artmış, belirgin Schaffer kolleratallerinin olduğu belirlenmiştir. Bu belirginlik otizmlili beyinlerde görülen aşırı büyümeye karşılık gelmektedir.

TPP'nin literatürde 1184 mg/kg olarak uygulanmış dozunun merkezi ve çevresel sinir sistemi üzerinde oldukça toksik etkileri bulunmaktadır (51). Çalışmamız ile TPP'nin ilk defa maternal maruziyetinin yavruların ergenlik dönemindeki yapısal ve davranışsal sonuçları üzerindeki bulguları literatüre kazandırılmıştır. TPP ve VPA grubunun histokimyasal bulguları birlikte değerlendirildiğinde hipokampusun DG ve SGZ'sinde benzer yapısal değişikliklere neden olduğu saptanmıştır.

Otizmde görülen tekrarlayıcı davranışlar için Bilye Gömme Testi kullanılmıştır. Wu ve meslektaşlarının yaptıkları çalışmada VPA uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla daha çok bilye gömerek tekrarlayıcı davranış gösterdikleri tespit edilmiştir (90). Degroote ve ark.larının yaptığı farklı bir otizm modellemesinde

tekrar edici davranışlar bilye gömme testi ile ölçülerek, kontrol grubuna göre daha fazla bilye gömme skoru elde edilmiştir (91). Genetik manipölasyonlarla oluşturulan tekrarlayıcı davranışları gösteren fare modellemesinde de bilye gömme sayısının arttığı gösterilmiştir (85). Literatürdeki tüm bu çalışmalarla karşılaştırıldığında bizim Bilye Gömme Testinden edindiğimiz bulgular literatürle korelasyon göstermektedir. TPP grubu ile VPA grubu kıyaslandığında ise her iki grupta da tekrarlayıcı davranışlar görülmüştür.

Otizmde görülen sosyal iletişimdeki bozulmaları ölçmek amacıyla Üç Odacıklı Sosyal Etkileşim Testi kullanılmıştır. Dai ve ark.larının VPA modellemesinde elde edilen sonuçlar VPA grubunun sosyal etkileşimlerinde bozulma olduğu belirlenmiştir (92). Yapılan diğer çalışmalarda SI, SPI skorlarında VPA gruplarında anlamlı bir fark bulunmuştur ve sosyal etkileşimin bozulduğu görülmüştür (93, 89). Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz istatistiksel bulgular literatürle karşılaştırıldığında VPA grubunun benzer şekilde sosyalliğinin bozulduğu SI değerinde anlamlı olarak bulunmuştur. Ancak VPA grubunun SPI değerinde istatistiksel bir fark görülmemekle beraber, ortalamalar göz önünde bulundurulduğunda kontrol grubuna kıyasla daha az sosyal yenilik tercihlerinde azalma görülmüştür.

Maternal TPP maruziyetinin yavruların sosyal davranışları üzerindeki etkileri bu çalışma ile birlikte literatüre kazandırılmıştır. Elde edilen verilere göre SI ve SPI değerlerinde hem kontrol hem de VPA grubuna göre istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur ve sosyal etkileşimlerinde bozulma olduğu gösterilmiştir.

11. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bilye Gömme testinden elde edilen sonuçlara göre TPP ve VPA gruplarının kontrol grubuna kıyasla otizme benzer tekrarlayıcı davranışlarında artış görülmüştür.

2. Sosyal Etkileşim testinden elde edilen sonuçlara göre TPP ve VPA gruplarının yabancı hayvanın yanında geçirdiği sürelerde azalma kaydedilmiştir. Bu sonuçlar TPP ve VPA grubundaki hayvanların otizmdekine benzer sosyal etkileşim bozukluklarının olduğunu ortaya koymuştur.

3. Histokimyasal boyamalardan elde edilen bulgulara göre VPA grubunun hipokampal yapısında bozulmalar saptanmıştır. DG, SGZ, CA4, CA3, CA2 ve CA1 bölgelerinde nörogelişimsel bozukluklara benzer farklılıklar görülmüştür.

4. TPP grubundaki histokimyasal boyamalardan elde edilen bulgular dominant olarak SGZ ve DG’de belirgindir. VPA grubundakine benzer bir görünüm saptanmıştır. CA4, CA3, CA2 ve CA1 bölgeleri normale yakın izlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler maternal maruz kalan TPP’nin ve VPA’nın nörogelişimsel bozukluklardakine benzer hipokampal ve davranışsal sonuçlar doğurduğunu göstermiştir. Bu açıdan bakıldığında gebelik döneminde çevrede bulunan zararlı maddelerden korunmanın önemine dikkat çekilmek istenmektedir. İleriki çalışmalarda her iki model için histopatolojik değerlendirmelerde immunohistokimyasal boyamalar, kantitatif analizler gereklidir ve ek davranış testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

12. KAYNAKLAR

1. Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*. 2012 May 1;129(5):e1121-8
2. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Jan;30(1):80.
3. Veronesi B, Padilla S, Newland D. Biochemical and neuropathological assessment of triphenyl phosphite in rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 1986 Apr 1;83(2):203-10.
4. Thomas, J. R., French, K. E. (1985). Gender differences across age in motor performance: A meta-analysis. *Psychological bulletin*, 98(2), 260.
5. Jeste SS. Neurodevelopmental behavioral and cognitive disorders. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2015 Jun 1;21(3, Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):690-714.
6. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, revised. Washington DC: American Psychiatric Association. 2000;943:2000.
7. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child*. 1943 Apr;2(3):217-50.
8. Öztürk MO, Uluşahin A. Ruh sağlığı ve bozuklukları. *Nobel Tıp Kitabevleri*; 2011.
9. Volkmar F, Siegel M, Woodbury-Smith M, King B, McCracken J. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2014 Feb 1;53(2):237-57.
10. Özkaya BT. Yaygın Gelişimsel Bozukluklardan Otizm Spektrum Bozukluğuna Geçiş: DSM-V'de Karşımıza Çıkacak Değişiklikler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*. 2013;5(2).
11. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Rosenberg CR, White T, Durkin MS. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*. 2018 Apr 27;67(6):1
12. McPartland J, Volkmar FR. Autism and related disorders. In *Handbook of clinical neurology* 2012 Jan 1 (Vol. 106, pp. 407-418). Elsevier.

13. Korkmaz B. Otizm: Klinik ve nörobiyolojik özellikleri, erken tanı, tedavi ve bazı güncel gelişmeler. *Turkish Pediatrics Archive/Turk Pediatri Arsivi*. 2010 Jun 3;45.
14. Tania M, Khan MA, Xia K. Recent advances in animal model experimentation in autism research. *Acta neuropsychiatrica*. 2014 Oct;26(5):264-71.)
15. Miles JH. Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genetics in Medicine*. 2011 Apr;13(4):278.
16. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*. 2011 Nov 7;68(11):1095-102.
17. Lichtenstein P, Carlström E, Råstam M, Gillberg C, Anckarsäter H. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *American Journal of Psychiatry*. 2010 Nov;167(11):1357-63.
18. Rutter M. Genetic influences and autism. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders, Volume 1, Third Edition*. 2005:425-52.
19. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*. 1995 Jan;25(1):63-77.
20. Lauritsen MB, Pedersen CB, Mortensen PB. Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2005 Sep 1;46(9):963-71.
21. Mukaddes NM. Otizm spektrum bozuklukları tanı ve takip. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2013.
22. Muratore, C.R., et al., Age-dependent decrease and alternative splicing of methionine synthase mRNA in human cerebral cortex and an accelerated decrease in autism. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e56927.
23. Lord, C. and A. Bailey, *Autism Spectrum Disorders*, in *Child and Adolescent Psychiatry*, M.J. Rutter and E.A. Taylor, Editors. 2002, Blackwell Publishing: Oxford. p. 636-663.
24. Dietert, R.R., J.M. Dietert, and J.C. Dewitt, Environmental risk factors for autism. *Emerg Health Threats J*, 2011. 4: p. 7111.
25. Gardener, H., D. Spiegelman, and S.L. Buka, Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 2009. 195(1): p. 7-14
26. Barak Y, Kimhi R, Stein D, Gutman J, Weizman A. Autistic subjects with comorbid epilepsy: a possible association with viral infections. *Child psychiatry and human development*. 1999 Mar 1;29(3):245-51

27. Shultz SR, MacFabe DF, Ossenkopp KP, Scratch S, Whelan J, Taylor R, Cain DP. 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*. 2008 May 1;54(6):901-11.
28. Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2005 Apr 1;23(2-3):189-99.
29. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*. 2006 Dec 16;368(9553):2167-78.
30. Meyza KZ, Defensor EB, Jensen AL, Corley MJ, Pearson BL, Pobbe RL, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. The BTBR T+ tf/J mouse model for autism spectrum disorders—in search of biomarkers. *Behavioural brain research*. 2013 Aug 15;251:25-34
31. Crawley JN. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Developmental Disabilities Research Reviews*. 2004 Nov 1;10(4):248-58.
32. Baudouin SJ, Gaudias J, Gerharz S, Hatstatt L, Zhou K, Punnakal P, Tanaka KF, Spooren W, Hen R, De Zeeuw CI, Vogt K. Shared synaptic pathophysiology in syndromic and nonsyndromic rodent models of autism. *Science*. 2012 Oct 5;338(6103):128-32.
33. Shultz SR, MacFabe DF, Martin S, Jackson J, Taylor R, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. 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. *Behavioural brain research*. 2009 Jun 8;200(1):33-41.
34. MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. 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. *Behavioural brain research*. 2011 Feb 2;217(1):47-54.
35. Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie*. 1963;18:435-8.
36. Landmark CJ. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical science monitor*. 2006 Dec 22;13(1):RA1-7
37. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental neurology*. 2017 May 2
38. Rouillet FI, Lai JK, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and teratology*. 2013 Mar 1;36:47-56.

39. Meador K, Reynolds MW, Crean S, Fahrbach K, Probst C. Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. *Epilepsy research*. 2008 Sep 1;81(1):1-3.
40. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M. Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *New England Journal of Medicine*. 2009 Apr 16;360(16):1597-605.)
41. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders*. 1994 Oct 1;24(5):659-85.
42. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA, Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*. 2008 Dec 2;71(23):1923-4.)
43. Terry LM, Johanson IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. *Developmental Psychobiology*. 1996 May;29(4):353-77.
44. Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biological psychiatry*. 2010 Dec 15;68(12):1100-6.
45. Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Yang SI, Cheong JH, et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague–Dawley rats. *Toxicol Lett* 2011;201:137–42.
46. Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *International journal of developmental neuroscience*. 2005 Apr 1;23(2-3):183-7.
47. Yochum CL, Dowling P, Reuhl KR, Wagner GC, Ming X. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain research*. 2008 Apr 8;1203:126-32.
48. Levin ED, Christopher NC, Abou-Donia MB. Triphenyl phosphite-induced impairment of spatial alternation learning. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*. 1995 Apr 1;44(4):461-7.
49. Veronesi B, Dvergsten C. TRIPHENYL PHOSPHITE NEUROPATHY DIFFERS FROM ORGANOPHOSPHORUS-INDUCED DELAYED NEUROPATHY IN RATS. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1987 May 1;13(3):193-208.
50. Triphenyl phosphite (TPP) is an industrial compound used extensively as an antioxidant, corrosion inhibitor, antiwear additive, and stabilizer (Mellite 3 10)

in the polymer industry (Bertram and Brandt, 1972; Protivovi IZ al., 1973; Kovacs and Wolkober, 1973)

51. Lehning EJ, Tanaka Jr D, Bursian SJ. Triphenyl phosphite and diisopropylphosphorofluoridate produce separate and distinct axonal degeneration patterns in the central nervous system of the rat. *Toxicological Sciences*. 1996 Jan 1;29(1):110-8.
52. Duvernoy HM. The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. Springer Science & Business Media; 2005 Jun 8
53. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*. 2004 Apr 1;161(4):598-607.
54. Guyton AC, Hall JE, Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican İ. Tıbbi fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
55. Arinci K, Elhan A. Anatomi. Gunes Kitapevi, Ankara. 1997:210-20.
56. Sadler TW. Langman's medical embryology. Lippincott Williams & Wilkins; 2011 Dec 15.
57. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*. 2007 Jan 1;163:3-790.
58. Andersen P, Morris R, Amaral D, O'Keefe J, Bliss T, editors. The hippocampus book. Oxford university press; 2007.
59. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas. Academic Press; 2017 Aug 29
60. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. Gray's anatomy 37th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1989.
61. WILLIAMS, Peter L. Gray's anatomy. Nervous system, 1995, 1240-1243.
62. İZCİ Y, ERBAŞ YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları.
63. y Cajal SR, Moreno A, de Felipe J, Sola RG, Navarro A. Neuronal and mixed neuronal glial tumors associated to epilepsy. A heterogeneous and related group of tumours. *Histology and histopathology*. 2001;16(2):613-22.
64. Marco P, Sola RG, Cajal SR, DeFelipe J. Loss of inhibitory synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoural neocortex: implications for epilepsy. *Brain research bulletin*. 1997 Jan 1;44(1):47-66.

65. Below HF. Postnatal Development Of The Human Hippocampal Formation. + Ahmed OJ, Mehta MR. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. Trends in neurosciences. 2009 Jun 1;32(6):329-38.
66. Tole S, Christian C, Grove EA. Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. Development. 1997 Dec 15;124(24):4959-70.
67. Kitazawa A, Kubo KI, Hayashi K, Matsunaga Y, Ishii K, Nakajima K. Hippocampal pyramidal neurons switch from a multipolar migration mode to a novel “climbing” migration mode during development. Journal of Neuroscience. 2014 Jan 22;34(4):1115-26.
68. Nakahira E, Yuasa S. Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. Journal of Comparative Neurology. 2005 Mar 14;483(3):329-40.
69. Scott JA, Schumann CM, Goodline-Jones BL, et al. A comprehensive volumetric analysis of the cerebellum in children and adolescents with autism spectrum disorder. Autism Res. 2009;2:246-257.
70. Ryu YH, Lee JD, Yoon PH, et al. Perfusion impairments in infantile autism on technetium-99m ethyl cysteinate dimer brain single-photon emission tomography: comparison with 90 findings on magnetic resonance imaging. Eur J Nucl Med. 1999; 26:253-259.
71. Challman, T.D., et al., The yield of the medical evaluation of children with pervasive developmental disorders. J Autism Dev Disord, 2003. 33(2): p. 187-92.
72. Yorbık, Ö., M. Özdağ, and T. Söhmen, Otistik bozuklukta EEG, BBT ve MRI inceleme sonuçları. Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi, 2001. 2: p. 94-98.
73. Courchesne, E., S. Webb, and C. Schumann, From toddlers to adults: the changing landscape of the brain in autism. Autism spectrum disorders, 2011: p. 611-631.
74. Gillberg C, Coleman M. The biology of the autistic syndromes. Cambridge University Press; 2000 Jan 18.
75. Diken, İ. (2011). Otistik bozukluğu olan öğrenciler. Özel eğitime gereksinimi olan öğrenciler ve özel eğitim. içinde Ankara: Pegem Akademi.
76. Schultz, R.T., Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. Int J Dev Neurosci, 2005. 23(2-3): p. 125-41.

77. Bauman, M.L. and T.L. Kemper, Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci*, 2005. 23(2-3): p. 183-7
78. Edgin JO, Pennington BF. Spatial cognition in autism spectrum disorders: Superior, impaired, or just intact?. *Journal of autism and developmental disorders*. 2005 Dec 1;35(6):729.
79. DeLong GR. Autism, amnesia, hippocampus, and learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992 Mar 1;16(1):63-70.
80. Gao J, Wang X, Sun H, Cao Y, Liang S, Wang H, Wang Y, Yang F, Zhang F, Wu L. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2016 Apr 1;49:67-78
81. Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta neuropathologica*. 1995 Dec 1;91(1):117-9.
82. (Groen W, Teluij M, Buitelaar J, Tendolkar I. Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2010 Jun 1;49(6):552-60.
83. Wass S. Distortions and disconnections: disrupted brain connectivity in autism. *Brain and cognition*. 2011 Feb 1;75(1):18-28.
84. Cuevas-Olguin R, Roychowdhury S, Banerjee A, Garcia-Oscos F, Esquivel-Rendon E, Bringas ME, Kilgard MP, Flores G, Atzori M. Cerebrolysin prevents deficits in social behavior, repetitive conduct, and synaptic inhibition in a rat model of autism. *Journal of neuroscience research*. 2017 Dec 1;95(12):2456-68.
85. Watanabe Y, Murakami T, Kawashima M, Hasegawa-Baba Y, Mizukami S, Imatanaka N, Akahori Y, Yoshida T, Shibutani M. Maternal exposure to valproic acid primarily targets interneurons followed by late effects on neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in rat offspring. *Neurotoxicity research*. 2017 Jan 1;31(1):46-62.
85. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2013(82).
86. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011(48).
87. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature genetics*. 2007 Jan;39(1):25.

88. Codagnone MG, Podestá MF, Uccelli NA, Reínés A. Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of autism. *Developmental neuroscience*. 2015;37(3):215-31.
89. Wu H, Wang X, Gao J, Liang S, Hao Y, Sun C, Xia W, Cao Y, Wu L. Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life sciences*. 2017 Mar 15;173:43-54.
90. Wu HF, Chen PS, Hsu YT, Lee CW, Wang TF, Chen YJ, Lin HC. D-cycloserine ameliorates autism-like deficits by removing GluA2-containing AMPA receptors in a valproic acid-induced rat model. *Molecular neurobiology*. 2017 Jul 21:1-4.
91. Degroote S, Hunting D, Takser L. Periconceptional folate deficiency leads to autism-like traits in Wistar rat offspring. *Neurotoxicology and teratology*. 2018 Jan 2.)
92. Dai X, Yin Y, Qin L. Valproic acid exposure decreases the mRNA stability of Bcl-2 via up-regulating miR-34a in the cerebellum of rat. *Neuroscience letters*. 2017 Sep 14;657:159-65.
93. Kim JW, Seung H, Kim KC, Gonzales EL, Oh HA, Yang SM, Ko MJ, Han SH, Banerjee S, Shin CY. Agmatine rescues autistic behaviors in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology*. 2017 Feb 1;113:71-81

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Petek Bilim

Doğum Yeri: Mersin

Doğum Tarihi: 14.08.1992

Medeni Durumu: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim:

- ✓ Ege Üniversitesi (2016 - Devam Ediyor), İzmir- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Yüksek Lisans Programı
- ✓ Toros Üniversitesi (2011-2016), Mersin - Psikoloji Lisans Eğitimi (GNO: 3,95)
- ✓ Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Anadolu Lisesi (2006-2010), Mersin – Fen Bilimleri

Sözel Sunumlar

Yardımcı, A.G., Pamuk, B.Ş., **Bilim, P.**, Çelik K., Maternal Uygulanan Valproik Asit ve Yavrularda Gastrointestinal Mezenter Nöron Gelişimine, Miyelinizasyona ve Enterik Glialara Etkisi (Danışman: Prof. Dr. Meral BAKA, Ege Üniversitesi Araştırma Eğitimi Projeleri En İyi Sözel Sunum)