



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN OTİZM
MODELİNDE MİTOKONDRIYAL DİNAMİKLERİN GELİŞİMSEL
SÜREÇTE İNCELENMESİ**

SAMED ÖZER
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜLDAL SÜYEN

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN OTİZM
MODELİNDE MİTOKONDRIYAL DİNAMİKLERİN
GELİŞİMSEL SÜREÇTE İNCELENMESİ**

SAMED ÖZER
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜLDAL SÜYEN

İSTANBUL-2022

Anabilim Dalı: FİZYOLOJİ
Program: FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
Tez Başlığı: SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE
OLUŞTURULAN OTİZM MODELİNDE
MİTOKONDRIYAL DİNAMİKLERİN
GELİŞİMSEL SÜREÇTE İNCELENMESİ
Öğrencinin Adı-Soyadı: SAMED ÖZER
Savunma Sınavı Tarihi: 04/07/2022

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Jüri Başkanı)	Prof. Dr. Yasemin ALANAY ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	PROF. DR. GÜLDAL SÜYEN ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ	İmza
Üye	Prof. Dr. Yasemin ALANAY ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ	İmza
Üye	Prof. Dr. Nevzat KAHVECİ BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ	İmza
Üye	Prof. Dr. NACİYE İŞBİL BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ	İmza
Üye	Doç. Dr. Hande YAPIŞLAR ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ	İmza

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih 04.07.2022

"SAMED ÖZER"

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Acıbadem Üniversitesi'nde işe başladığım dönemde, içimde ukte kalan doktora eğitimini tekrar gündeme getiren, işe başladığım ilk günden bu yana neredeyse hergün yeni birşeyler öğrenmeme vesile olan yüce gönüllü, akıl hocam Prof. Dr. Güldal SÜYEN'e,

Doktora eğitim hayatıma özel öğrenci olarak başladığım Bursa Uludağ Üniversitesi'ndeki değerli hocalarım Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK, Prof. Dr. Nevzat KAHVECİ, Prof. Dr. Naciye İŞBİL'e

Mesleki dayanışması ile her zaman yanımda olan ve kariyer hayatıma yön veren Yeditepe Üniversitesi, Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a

Tezime ilişkin deneylerde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU ve yüksek lisans öğrencisi İlayda DARILMAZ ile Doç. Dr. Devrim ÖZ ARSLAN'a

Doktora eğitimim sürecinde bir aile olarak hissettiğim üniversitemizin Fizyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Hande YAPIŞLAR, Meltem KOLGAZİ, Mehmet ERGEN'e ve birlikte güzel günler geçirdiğim kalpleri temiz, doktora dönem arkadaşlarım Özgür YILMAZ, Sümeyye ÇİLİNGİR ve küçüğümüz Dilan ACAR'a

Deneyler sırasında yükümü hafifleten doktor adaylarımız Efe SARI ve Metincan ERKAYA'ya, çalışma arkadaşlarım Efsun, Tuğba, Canan ve Aslı'ya,

Lojistik destekleri ile yüzümü güldüren Selma ÇAT, Görkem GÜN'e ve Prof. Dr. Ercüment OVALI ve değerli araştırma ekibine,

Hayatım boyunca dualarını esirgemeyen, her daim yanımda olan babam, annem ve kardeşlerime, vaktinden çaldığım güzel kızıma sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Veteriner Hekim Samed Özer

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	v
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Otizm.....	6
2.1.1 Otizmin epidemiyolojisi.....	6
2.1.2 Otizmin etiyolojisi	6
2.1.3 Otizmin patofizyolojisi	7
2.1.4 Otizmde terapötik yaklaşımlar	8
2.2 Mitokondri ve Yapısı.....	11
2.3 Otizm ve Mitokondri İlişkisi.....	11
2.4 Mitokondriyal Dinamikler	13
2.4.1 Mitokondriyal füzyon	13
2.4.2 Mitokondriyal füzyon	14
2.4.3 Mitofaji	15
2.4.4 Mitokondri ve oksidatif stress	18
2.4.5 Mitokondriyal dinamikler ve nörodejeneratif hastalıklar.....	19
2.5 Otizm Hayvan Modelleri.....	21
2.5.1 Genetik otizm modelleri	22
2.5.2 Çevresel faktörlerle indüklenmiş otizm modelleri.....	25
2.6 Valproik Asit (VPA)	26
3 GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1 Sıçanlarda Otizm Modelinin ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	28
3.1.1 Deney hayvanları temini	28
3.1.2 Deney gruplarının oluşturulması	28
3.1.2.1 Zaman noktaları	29
3.1.2.2 Kontrol grubu	29
3.1.2.3 Vpa grubu	29
3.2 Bilişsel/Davranışsal Testler	30
3.2.1 Açık alan testi.....	31
3.2.2 Üç odalı sosyal etkileşim testi.....	32
3.2.3 Y labirent testi.....	33

3.2.4	Morris su labirenti testi.....	33
3.2.5	Yükseltilmiş artı labirent testi	34
3.2.6	Deneyin sonlandırılması.....	34
3.3	Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi	35
3.3.1	RNA izolasyonu ve gen ifadesi analizleri.....	35
3.3.1.1	RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	35
3.3.1.2	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile gen ifadesinin belirlenmesi	35
3.3.2	Mitokondriyal dinamiklerin akış sitometrisi ile ölçümü.....	37
3.4	İstatistiksel Analiz.....	37
4	BULGULAR	39
4.1	Bilişsel/Davranışsal Testler	39
4.1.1	Açık alan testi.....	39
4.1.2	Üç odalı sosyal etkileşim testi.....	39
4.1.3	Y labirent testi.....	41
4.1.4	Morris su labirenti testi.....	42
4.1.5	Yükseltilmiş artı labirent testi	45
4.2	Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi	46
4.2.1	Gen ifadesi analizleri	46
4.2.2	Mitokondriyal dinamiklerin akış sitometrisi ile ölçümü.....	52
5	TARTIŞMA.....	58
5.1	Bilişsel/Davranışsal Testler	58
5.2	Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi	61
6	SONUÇ	67
7	KAYNAKLAR.....	70
8	EKLER	85
8.1	EK 1: Hayvan deneyleri yerel etik kurul izni	85
9	ÖZGEÇMİŞ	86

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

AH	Alzheimer Hastalığı
APS	Amonyum Peroksodisulfat
BDV	Borna Hastalığı Virüsü
CHD8	Kromodomain Helikaz DNA Bağlayıcı Protein 8
CMT	Periferik nöropati Charcot-Marie-Tooth
DEHB	Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğu
DRP	Dinaminle ilişkili protein
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EGTA	Etilen Glikol-Bis Tetraasetik Asit
ETZ	Elektron transport zinciri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FMR1	Fragile X Mental Retardation 1
FXS	Frajil X Sendromu
Gİ	Gastrointestinal
GİN	Girişkenlik indeksi
IgG	İmmünoglobulin G
Iglur	İyonotropik Glutamat Reseptörü
IL	Interleukin
Inos	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LIR	LC3-etkileşim bölgesi
LTP	Long Term Potensiyalizasyon
MDA	Malon Dialdehit
Mfn	Mitofusin
MIA	Maternal İmmün Aktivasyon
MS	Multiple Skleroz
PH	Parkinson Hastalığı
NF	Nörofilament
NLGN	Nöroligin
NLR	Nod-benzeri reseptörlerin
NRXN	Nöreksin
OPA1	Optik Atrofi 1

OSB	Otizm spektrum bozukluğu
OSD	Otizm Spektrum Bozukluğu
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücreler
PINK1	PTEN-İnduced Putative Kinase
PINK1	PTEN-induced putative kinase
POGZ	Pogo Transposable Element Derived With ZNF Domain
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTT	Rett Sendromunun
S1P	Sfingozin-1-Fosfat
SHANK3	SH3 ve Multiple Ankirin Repeat Domains Protein 3
SQSTM1	Sequestosome 1
STİ	Sosyal tercih indeksi
TSC	Tüberoskleroz Kompleksi
VPA	Valproik Asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mitokondriyal dinamikler	15
Şekil 2. Mitokondri kalite kontrol yolları.	17
Şekil 3. Deney süreci.....	29
Şekil 4. Davranış deneyleri şeması.	31
Şekil 5. Açık alan testi sonuçları (* $p<0.05$ Kontrol dışı grubuna göre, $^{\tau} p<0.05$ VPA dışı grubuna göre)	39
Şekil 6. Üç Odalı Sosyal Etkileşim testi (A) Girişkenlik indeksi ve (B) Sosyal Tercih indeksi sonuçları (* $p<0.05$ Kontrol dışı grubuna göre).	41
Şekil 7. Y labirenti testi alterasyon (%) sonuçları.....	42
Şekil 8. (A-B) Morris su labirenti eğitim fazı boyunca platformu bulma süreleri (* $p<0,05$ VPA erkek grubuna göre, *** $p<0,001$ VPA Dişi grubuna göre, # $p<0,001$ VPA Dişi grubuna göre).....	44
Şekil 9. Morris su labirenti prob fazında (A) hedef kadranda geçirilen süre ve (B) platform çaprazlama sayısı (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$ VPA Dişi grubuna göre).....	45
Şekil 10. Yükseltilmiş artı labirent testi kapalı kolda geçirdikleri süre (* $p<0,05$ VPA Dişi grubuna göre).....	46
Şekil 11. Postnatal 21 (cinsiyet gözetmeksizin) ve 50. günde (cinsiyete göre) kontrol ve VPA grubu hayvanlarda (A) <i>VDAC1</i> , (B) <i>COX IV</i> , (C) <i>Bnip3</i> , (D) <i>PARKIN</i> , (E) <i>PINK1</i> , (F) <i>P62</i> , (G) <i>LC3B</i> ve (H) <i>OPA</i> genlerinin relatif ifadeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$).	49
Şekil 12. Postnatal 21 ve 50. günde (cinsiyet gözetmeksizin) kontrol ve VPA grubu hayvanlarda (A) <i>VDAC1</i> , (B) <i>COX IV</i> , (C) <i>Bnip3</i> , (D) <i>PARKIN</i> , (E) <i>PINK1</i> , (F) <i>P62</i> , (G) <i>LC3B</i> ve (H) <i>OPA</i> genlerinin relatif ifadeleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ ve *** $p<0,0001$).	51

Şekil 13. Postnatal 21. gün kontrol ve VPA grubu sıçanlarda lenfosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (*p<0,05 ve **p<0,01).	53
Şekil 14. Postnatal 50. gün kontrol ve VPA Erkek grubu ve dişi sıçanlarda lenfosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).	54
Şekil 15. Postnatal 21. gün kontrol ve VPA grubu sıçanlarda monosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (*p<0,05 ve p<0,01).	56
Şekil 16. Postnatal 50. gün kontrol ve VPA grubu erkek ve dişi sıçanlarda monosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (**p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).	57
Şekil 17. P21’de periferik lenfosit ve monositlerdeki mitokondriyal dinamiklerin genel bir özeti.....	67
Şekil 18. P50’de (A) davranışsal/bilişsel test sonuçlarının ve (B) mitokondriyal dinamiklerin genel bir özeti.	68

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. qRT-PCR döngüsü..... 35

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer dizileri..... 36



ÖZET

Sıçanlarda Valproik Asit İle Oluşturulan Otizm Modelinde Mitokondriyal Dinamiklerin Gelişimsel Süreçte İncelenmesi

Otizm kompleks nörogelişimsel bir hastalık olup iki ana semptom grubu ile karakterizedir, bunlar sosyal iletişim bozukluğu ve tekrarlayıcı/kısıtlı davranışlardır. Bunlara epilepsi, hiperaktivite, dikkat eksikliği, uyku bozuklukları ve gastrointestinal şikayetler eşlik edebilir. Son yıllarda prevalansı giderek artan otizmin patofizyolojisi tamamen açıklanamamıştır. Genetik faktörlerin yanında immun sistem ve mitokondriyal bozukluklar, inflamasyon, çevresel toksinler, gebelikte kullanılan bazı ilaçların otizmin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar, mitokondriyal dinamik ve/veya fonksiyon bozukluğunun otizmle ilişkili olabileceğini işaret etmektedir. Gebelikte anti-epileptik ilaç olarak kullanılan valproik asitin (VPA) otizm insidansını anlamlı olarak artırdığı bilinmektedir. VPA modeli otizm araştırmalarında yaygın olarak kullanılan ve insanlardaki otizm etiyojilerinden birini taklit etmesi yönüyle de değerlidir. Çalışmamızda VPA indüklü otizm modeli dişi ve erkek sıçanlarda, bilişsel/davranışsal parametreler ile kortikal doku ve periferik kanda mitokondriyal dinamikleri inceledik. Çalışmamızın sonuçlarına göre, dişi sıçanlarda anksiyetede artış, lokomotor aktivite, öğrenme ve bellek ve sosyal davranışta bozulma gözlenmiştir. VPA oksidatif fosforilasyon, mitofaji ve mitokondriyal füzyon ile ilişkili genleri her iki cinsiyette bozmuş ve bu bozukluk dişilerde daha belirgin bulunmuştur. Periferik monosit ve lenfositlerde hem dişi hem de erkek VPA grubu sıçanlarda mitokondriyal kütle, membran potansiyeli ve reaktif oksijen türleri miktarı bozulmuş, bu bozukluklar cinsiyete göre farklılıklar göstermiştir. Sonuç olarak, gebelikte VPA maruziyeti otizme sebep olurken, otizmin şiddeti ve mitokondriyal dinamikler üzerine etkisi cinsiyete göre değişmektedir. Postnatal 21. günde, mitokondriyal dinamiklerde değişiklik gözlenmeyip postnatal 50. günde değişiklik gözlenmesi, mitokondriyal dinamiklerin otizmin gelişim sürecinde bozulduğunu düşündürmektedir. Bu yolların aydınlatılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Otizm, Valproik asit, Mitokondriyal dinamikler, Prefrontal korteks, Sıçan

ABSTRACT

Investigation of Mitochondrial Dynamics in the Developmental Process in a Valproic Acid-Induced Autism Model in Rats

Autism is a complex neurodevelopmental disorder characterized by two main symptom groups: social communication disorder and repetitive or restrictive behaviors and interests. In addition to these symptoms, epilepsy, hyperactivity, attention deficit, sleep disorders and gastrointestinal complaints accompany autism. The pathophysiology of autism, the prevalence of which has increased in the last 10 years, has not yet been fully elucidated. In addition to genetic factors, there are studies showing that immune system disorders, mitochondrial disorders, inflammation, environmental toxins, some drugs used during pregnancy and intestinal microbiota play a role in the pathogenesis. Recent studies have indicated that mitochondrial dynamics and/or dysfunction may be associated with autism. It is known that valproic acid (VPA), used as an antiepileptic drug during pregnancy, significantly increases the incidence of autism. The VPA model is a valuable model that is widely used in autism research and mimics one of the etiologies of autism in humans. In this study, we aimed to investigate mitochondrial dynamics in cortical and peripheral blood, as well as cognitive/behavioral parameters in male and female rats of VPA-induced autism model. According to the results of our study, anxiety, locomotor activity, learning and memory, and social behavior were worse in VPA group of female rats. VPA deregulated genes associated with oxidative phosphorylation, mitophagy, and mitochondrial fusion in both sexes, and this deregulation was more pronounced in females. Mitochondrial mass, membrane potential and amount of reactive oxygen species were deregulated in peripheral monocytes and lymphocytes in both female and male VPA group rats, and these deregulations showed differences according to gender. In conclusion, while the use of VPA during pregnancy causes autism, the severity of autism and its effect on mitochondrial dynamics vary according to gender. More detailed studies are needed to elucidate these pathways.

Keywords: Autism, Valproic acid, Mitochondrial dynamics, Prefrontal cortex, Rat

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm, yaşamın ilk üç yılı içinde ortaya çıkan ve yaşam boyu devam eden, sosyal etkileşim, sözel ve sözel olmayan iletişimde problemler, tekrarlayıcı davranış ve kısıtlı ilgi alanları ile kendini gösteren, nörogelişimsel bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (1, 2). Bu ana semptomların yanı sıra öğrenme ve bellek problemleri, anksiyete ve hiperaktivite gibi bilişsel ve davranışsal bozukluklar da sıklıkla hastalığa eşlik etmektedir (3-6). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılı verilerine göre doğan her 160 çocuktan bir tanesi otizmlili olarak dünyaya gelmekte ve son 50 yıldır bu oran giderek artmaktadır. Otizm görülme sıklığı erkeklerde kızlara göre dört kat daha fazladır (7).

Otizm ilk olarak 1943 yılında Avusturyalı psikiyatrist Leo Kanner tarafından tanımlanmıştır (8). Kanner, sosyal ve davranışsal birtakım güçlükler yaşayan bir grup çocukla yapmış olduğu çalışma sonucunda hastalığa erken çocukluk otizmi adını vermiştir. 1980 yılında Amerikan Psikiyatri Birliği'nin yayınladığı Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-DSM) üçüncü versiyonunda hastalık otistik bozukluk olarak sınıflandırılmıştır (9). DSM'nin bir sonraki versiyonu olan DSM-IV 'de hastalık 4 farklı tanı grubuna ayrılmıştır. Bunlar Otistik Bozukluk, Asperger Sendromu, Çocukluk Dönemi Dezintegratif Bozukluğu ve başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluktur (10). Bununla birlikte, farklı tanı grupları üzerinde yapılan çalışmalar grupların etiyolojilerinin aynı ve klinik görünümünün de benzer olduklarını gösterdiğinden, DSM-V'de hastalık tek bir tanı grubu altında, otizm spektrum bozukluğu (OSB) olarak sınıflandırılmaktadır (11).

Bu tezde, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun otizmin nedeni mi yoksa otizmin gelişimi sürecinde/sonucunda mı ortaya çıktığı; nörogelişimsel bir hastalık olan otizmin gelişimi sırasında etkilenen prefrontal korteksdeki (PFC) mitokondriyal dinamik/fonksiyon farklılıkları ve bu farklılıkların otizm gelişiminin hangi aşamasında ortaya çıktığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, valproik asit (VPA) ile sıçanlarda otizm modeli oluşturularak postnatal gelişim süreçlerinde periferik ve beyin dokusundaki mitokondriyal dinamikler incelenmiştir. Mitokondri fonksiyonundaki bozukluk karbonhidrat, yağ ve amino asit metabolizmasının bozulmasına, apoptozun

artmasına, kalsiyum regülasyonunun bozulmasına, hormonal veya transkripsiyonal kontrolün bozulmasına, reaktif oksijen türlerinin üretiminin ve oksidatif stresin artırmasına, immün cevabın ve bağırsak-beyin aksının bozulmasına neden olmaktadır.

Hücre içindeki yaşamsal öneme sahip bu yollar üzerindeki mitokondrinin etkisi dikkate alındığında; otizmlili çocuklara mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun etkisini azaltmak amacıyla L-karnitin, koenzim Q gibi kofaktör tedavisi ve ketojenik diyet uygulanarak ve erken müdahale ile hücreye verilen hasar en aza indirilebilir. Bu nedenle, bu proje ile mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun otizm gelişiminin hangi basamağında ortaya çıktığı ve otizmin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunun açıklığa kavuşturulması ve otizme bağlı bilişsel davranışsal bozukluklar üzerine etkisinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Hedefler:

1. Sıçanlarda VPA ile otizm modelinin oluşturulması,
2. Mitokondriyal fonksiyonların aydınlatılması amacıyla gebe annelere VPA enjeksiyonundan sonra postnatal yavruların (P21 ve P50 zaman noktalarında) sakrifiye edilerek kan ve prefrontal korteks örneklerinin toplanması,
3. Kontrol grubu için gebe annelere intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapılarak P21 ve P50 zaman noktalarında dekapite edilerek kan ve prefrontal korteks örneklerinin toplanması,
4. Tüm deney gruplarındaki yavrulara P36'dan başlayarak P50 günü dekapitasyon öncesine kadar bilişsel/davranışsal test bataryasına tabi tutularak otizmin bilişsel/davranışsal etkilerinin belirlenmesi,
5. Otizmlili ve kontrol deney gruplarının prefrontal korteksinde mitokondriyal füzyon, füzyon ve mitofaji belirteçlerinin gen ekspresyon düzeylerinin belirlenerek mitokondri dinamiklerinin otizmin gelişimsel süreçteki değişimine etkisinin belirlenmesi,
6. Deneklerden P21 ve P50. günlerde alınan örneklerden periferik kan mononükleer (PBMC) hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli, kütlesi ve süperoksit

üretimin ölçümünün belirlenmesi ve böylece otizmin periferal sistemdeki etkisinin belirlenmesi,

7. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun otizmin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunun belirlenmesi,

8. Otizm benzeri davranışlarda ve mitokondriyal dinamiklerde cinsiyetler arası olası farklılıkların araştırılmasıdır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Otizm

Otizm spektrum bozukluğu (OSB) olarak da bilinen otizm, altta yatan kognitif özelliklere sahip olan ve genellikle çeşitli diğer durumlarla birlikte görülen yaygın, kalıtsal ve heterojen bir nörogelişimsel bozukluk olarak tanımlanır (12). OSB sosyal iletişimde eksiklik, sınırlı ilgi alanları ve tekrarlayan davranış varlığı ile karakterizedir (13). Bu temel semptomların yanında, otizmlili kişilerde hiperaktivite ve dikkat bozuklukları (dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB) gibi), anksiyete, depresyon ve epilepsi gibi psikiyatrik veya nörolojik bozukluklar oldukça yaygın olarak görülmektedir (12). Otizm tanısı, genellikle ebeveynlerden ayrıntılı bir gelişim öyküsü alındıktan ve bireyin ebeveynleri veya diğer bireylerle olan etkileşimi gözlemlenerek konur (14, 15). Bunun yanında çeşitli yaşlardaki popülasyonlar üzerinde uygulanan farklı tarama araçları bulunmaktadır (16). Yazının bu kısmından sonrası OSB genel olarak otizm olarak adlandırılacaktır.

2.1.1 Otizmin epidemiyolojisi

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar otizmin erkeklerde kadınlara göre daha yaygın görüldüğünü göstermekte olup (kadın/erkek= 1/2 – 1/5) 2010 Global Burden of Disease çalışmasında 1/4 olarak tahmin edilmektedir (17, 18). Dünyada yaklaşık her 100 çocuktan biri otizm teşhisi almaktadır (19). Bunun yanında prevalans tahminleri zamanla yükselmiş ve sosyodemografik gruplar içinde ve arasında büyük farklılıklar göstermiştir (19). Bu bulgular, otizmin tanımındaki değişiklikleri ve prevalans çalışmalarının metodoloji ve bağlamlarındaki farklılıkları yansıtmaktadır (19).

2.1.2 Otizmin etiyolojisi

Otizmin hem genetik hem de çevresel faktörlerin tek tek veya birlikte etkili olduğu çok faktörlü bir hastalıktır (20). Otizm, sendromik ve sendromik olmayan otizm olarak sınıflandırılmaktadır (20). Sendromik otizmin sebebi genellikle kromozomal anomaliler veya monogenik alterasyonlarla ilişkiliyken sendromik olmayan otizmin etiyolojisi ise prenatal ve postnatal çevresel faktörler ve de novo mutasyonların ortak rol oynaması ve genetik heterojenite sebebiyle henüz tamamen belirlenememiştir (20).

Otizmin yüksek kalıtsallığı çeşitli çalışmalar tarafından belirtilmiştir. Epidemiyolojik ikiz çalışmaları da otizmin bu güçlü genetik yanını yansıtmakta olup tek yumurta ikizlerinde konkordans oranı tek yumurta ikizlerinde %70-90, çift yumurta ikizlerinde ise %0-10 olarak belirtilmiştir (21). Hâlihazırda otizm vakalarının bulunduğu ailelerde ise ailesel kümelenmeler görülebilir; aile bireylerinde otizm tanısı olan küçük kardeşler daha fazla otizm riski altında olup daha küçük erkek kardeşlerde bu risk daha yüksektir (22, 23). Otizimli çocuk ve erişkinlerin %20-25'inde genetik sebepler de novo mutasyonlar, genel ve nadir genetik varyasyonlar ve otizm ilişkili genel polimorfizmler olarak bildirilmiştir (21, 24, 25).

Otizm riskine katkıda bulunan genetik olmayan faktörler parental yaş, maternal beslenme ve metabolik durum, gebelik sırasında enfeksiyon, prenatal stres ve belirli toksin, ağır metal veya ilaçlara maruziyeti içerebilir (20). Bazı çalışmalar artan parental yaş ile otizm riskinin arttığı belirtirken (26) bazı çalışmalar bu hipotezi reddetmektedir (27). Maternal beslenmede beyin gelişimini etkileyen folik asit ve metal homeostaz bozukluğu da otizm riskiyle ilişkilendirilmiştir (28, 29). Maternal enfeksiyon otizmle ilişkilendirilen bir diğer genetik olmayan otizm risk faktörü olduğu belirtilmiştir (30, 31). Maternal ilaç maruziyeti, özellikle antiepileptik ve antidepresanlara maruziyet, otizm riskiyle ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda prenatal VPA maruziyetinin çocuklarda otizm tanı riskini arttırdığı bildirilmiştir (32-35). Bunun yanında selektif serotonin geri alım inhibitörü türü antidepresan kullanımının da otizm riskini arttırabileceği belirtilirken bulunan sonuçlar çelişkilidir (36).

2.1.3 Otizmin patofizyolojisi

Otizm patolojisinde hem serebral hem de ekstraserebral faktörler rol alır. Yapılan çeşitli çalışmalarda sonraki dönemlerde otizm tanısı alan 1 – 4 yaş arası çocuklarda baş çevresinde ve intrakraniyal hacimde artış gibi çeşitli anomaliler bildirilmiştir (37). Genç ve erişkin otizm hastalarında benzer şekilde farklı beyin bölgelerinde anatomik değişiklikler gözlemlenmiştir (37, 38). Ancak bu gözlemlenen anomaliler direkt olarak otizimli hastaların klinik fenotipiyle ilişkilendirilemez (20). Otizimli hastaların beyinlerindeki nöral bağlantılarda da farklılıklar gözlemlenmiş olup bu farklılıkların otizm patofizyolojisi ile ilişkisinin doğrulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç

bulunmaktadır (39). Otizmlı bireylerde hücresele düzeyde de farklılıklar raporlanmıştır. Örneğın otizmlı hastaların serebellar purkinje hücrelerinde azaldığı gözlenmiştir (40). Bunun yanında sinaptik disfonksiyon ve sinaptik homeostazda ve fonksiyonda rol oynayan çeşitli protein ve genlerdeki dereğülasyon/mutasyonlar da otizm patolojisinde önemli belirteçlerdir (40-45).

Yıllardır yapılan çalışmalar genellikle otizmde beyin gelişimi ve fonksiyonu üzerine eğilmiştir, ancak son zamanlarda bağırsak-beyin eksenli immun cevap üzerine yapılan çalışmalar otizm patolojisinin merkezi sinir sistemi dışında da bulunabileceğini göstermiştir (20). Gastrointestinal (Gİ) bozuklukların otizmlı bireylerde %20 – 86 oranında görüldüğü bildirilmiştir (46). Gİ bozukluklara ek olarak, Gİ bozuklukların şiddetinin de otizm seviyesiyle korelasyon gösterdiği raporlanmıştır (47). Bağırsak mikrobiyomu çalışmalarında, otizm hastalarının mikrobiyomunun otistik olmayanlarınkine kıyasla farklılık gösterdiği raporlanmıştır (48-51). Bakteriyel floradaki değışim ve anormal bağırsak epitel bariyer fonksiyonu sonucu ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın direkt ya da indirekt olarak serebral fonksiyonu etkileyebileceğı ve otizm nöropatolojisine katkıda bulunabileceğı belirtilmiştir (52, 53).

2.1.4 Otizmde terapötik yaklaşımlar

Otizmin hasta, bakım veren kişiler ve toplum için sosyal ve ekonomik yükü oldukça yüksek olmasına karşın, hastalığın kesin etiyolojisini belirlemek oldukça zor ve tedavi seçenekleri çok kısıtlıdır (54). Uygulanan farmakolojik tedaviler otizmin ana semptomlarından ziyade anksiyete, depresyon ve diğere davranışsal problemlere yöneliktir (55). Halen otizmde kullanılması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir farmakolojik ajan olan risperidon iritabiliteyi ve kısmen tekrarlayıcı davranışları önlese de sosyal iletişim problemlerine bir çözüm oluşturmamaktadır (56). Bununla birlikte aripiprazol de FDA tarafından onaylanmış olup kısa dönem takiplerde otizm semptomlarında azalma sağladığı belirtilmiştir (57). Ancak her iki farmakolojik ajan için de daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Özel eğitim ve davranışsal yaklaşımlar standart olarak uygulanmakla birlikte pek çok tedavi yaklaşımı ile ilişkili bilimsel çalışmalar henüz yetersizdir.

Biyoaktif bir lipid olan sfingozin-1-fosfat (S1P) beş farklı reseptör G protein kenetli reseptör aracılığı ile hücre sinyal iletiliminde görev yapmaktadır. Hücre farklılaşmasından hücre ölümüne kadar çok çeşitli süreçlerde kritik öneme sahiptir. Reseptör ekspresyonları hücreler arasında farklılık gösterirken beyin dokusunda hemen hemen hepsi bulunmaktadır. S1P beyin gelişimi için önemli olmasına rağmen, hipokampal nöronlarda apoptozu da indükleyebilmektedir. Hücre içi S1P düzeyi mikroglial aktivasyon ile direkt ilişkilidir. Aktif mikroglia artmış pro-inflamatuar (IL-1beta) IL-6) üzerinden nöronlara zarar verebilir. Sfingolipidler merkezi sinir sisteminde oldukça fazladır ve yapısal olarak zar bütünlüğüne, zarların akıcılığına ve myelin tabakaya katkıda bulunur. Artan sayıdaki yayınlar sfingolipid metabolizmasının Alzheimer Hastalığı (AH), multiple Skleroz (MS), Parkinson Hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıklarda bozulduğunu işaret etmektedir. Ancak bu metabolizmanın farmakolojik olarak düzenlenmesine ilişkin çok az araştırma olduğu dikkat çekmektedir.

Lenfosit zarlarında bulunan S1P1 reseptörünün ekspresyonunun azalması bu hücrelerin lenf nodlarına geçişini azaltır ve patojenik T hücrelerinin merkezi sinir sisteminde invazyonunu engelleyerek immün yanıtın düzenlenmesinde önemlidir. Otizmlilerde sıkça T hücresi, B hücresi, monositler, doğal öldürücü hücreleri (NK) ve dendritik hücrelerinde değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda immünglobulinlerde değişiklikler ve otoantikor düzeylerinin arttığı da gösterilmiştir. Ek olarak nöroinflamasyonla ilişkili periferik sitokin ve kemokinlerin düzeyinde artış gözlenmiştir (58, 59). S1P gibi biyoaktif lipidlerin immün sistemin düzenlenmesinde çok önemli bir aracı olduğu düşünülmektedir. S1P reseptörünün ekspresyonu ve S1P konsantrasyon gradyanı immün hücrelerinin farklılaşması, akut ve kronik inflamasyon sırasındaki göçünde (migration) etkilidir. Pek çok yayın FTY720 gibi, S1P sinyal yolağında etkili moleküllerin yeni bir tedavi yaklaşımı olarak MS hastalığına ek olarak otoimmün hastalıklar, alerji, enfeksiyon ve kronik inflamasyonda kullanılabileceğini işaret etmektedir (60).

OSB ve nöroinflamasyonla ilişkisi otizmlilerde çocukların periferik kan mononükleer hücrelerinin antijenle uyarılması sonucunda serumda TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, ve IL-12 gibi sitokinlerin arttığı bildirilmiştir (61, 62). İnflamasyonun oluşumuna neden olan

ve enflamozom adı verilen hücre içi protein komplekslerinin agregasyonu proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Enflamozom aktivasyonu Nod-benzeri reseptörlerin (NLR) antijen ya da hasarlı hücreden salınan mikrobiyal olmayan tehlike sinyali ile birleşmesi sonucu oluşur. NLRP1, NLRP3, IPAF ve AIM2 olarak dört enflamozom kompleksi arasında NLRP3 en iyi karakterize edilmiş olanıdır. NLRP3 hücre içinde pek çok sinyal tarafından uyarılmaktadır. Bu uyarı daha sonra enflamatuvar kaspaz olarak bilinen kaspaz-1 ve IL-1 beta ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasında neden olmaktadır (63). Kaspaz-1, NLRP3 aracılı inflamasyonun oluşumunda rol oynadığı için bu projede seçilmiştir. Piancone ve ark. OSB olan hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde bu enflamatuvar yolağın aktive olduğunu göstermişlerdir (64).

Ek olarak, son yıllarda yapılan araştırmalar mitokondrinin immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Mitokondrinin düzgün bir şekilde çalışması, immün hücrelerinin üretilmesi, fenotipik özelliklerinin korunması ve aktiviteleri için önemli bir yer tutar (65). Eğer hücrelerde mitokondrilerde hasarlar ortaya çıkar ve düzgün bir şekilde mitofaji aracılığıyla yok edilemezse inflamatuvar sinyal yolağının hiperaktivasyonuna sebep olarak kronik sistemik inflamasyon ve inflamatuvar hastalıkların gelişimine yol açar (66). Bu nedenlerle bu projede mitokondriyal solunumdaki değişimlerin VPA ile oluşturulan otizmlili sıçanların gelişimsel süreçleri araştırılmıştır.

Sinapslarda meydana gelen fonksiyonel kayıp, otizm ve şizofreni gibi etiyolojisi tam olarak bilinmeyen nöropsikiyatrik bozukluklarda ortak görülen patolojik bir durumdur (67). Membranla ilişkili bir guanilat kinaz olan ve postsinaptik olarak yerleşen PSD-95, postsinaptik ucun dayanıklılığını sağlayan önemli bir ana iskelet proteindir (68). Nörofilamentler (NF'ler), NFL, NFM, NFH ve α -interneksin (INT) alt birimlerinin biraraya gelerek oluşturduğu heteropolimer yapılardır. Aksonların radyal büyümesi için gereken yapısal proteinler olup, büyük motor nöronların dendritlerini destekledikleri de düşünülmektedir (69).

2.2 Mitokondri ve Yapısı

Mitokondri, çoğu ökaryotik hücrede bulunan oldukça dinamik çift zara sahip bir organeldir. Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla enerji üretimi, çeşitli metabolik yolların entegrasyonu, apoptozun düzenlenmesi ve kalsiyum homeostazının korunması dahil olmak üzere hücrelerde kritik roller oynarlar (70).

Mitokondri, bir dış zar, zarlar arası boşluk, iç zar ve matristen oluşur. Dış zar üç ayrılmaz protein ailesi içerir: dış mitokondriyal zar kompleksinin translokazı, ayırma ve birleştirme makine kompleksi ve porinler. İç zar, oksidatif fosforilasyondan sorumlu enzim komplekslerini içeren crista oluşturmak üzere katlanır. Mitokondriyal matris, trikarboksilik asit döngüsünün gerçekleştiği yerdir. Ayrıca 16.5 kb çift sarmallı kapalı dairesel DNA olan mitokondriyal genomu da içerir. Mitokondriyal genom, 13 OXPHOS proteinini, 2 ribozomal RNA'yı (12S ve 16S rRNA) ve 22 transfer RNA'sını kodlayan 37 gen den oluşur. Mitokondriyal proteinlerin çoğu (~ 1500) nükleer genler tarafından kodlanır ve sentezlerinden sonra sitozolden mitokondriye aktarılır (71).

Mitokondriyal bütünlüğün ve homeostazın korunması son derece kritiktir. Bu nedenle mitokondri, füzyon ve fisyon süreçleri yoluyla sayı ve morfolojilerinde sürekli olarak değişikliklere uğrar. Bu "mitokondriyal dinamikler", mitokondriyal içeriğin verimli bir şekilde taşınmasına ve dağıtılmasına izin vererek bir hücre içindeki mitokondri havuzunun ve optimal OXPHOS aktivitesinin korunmasına yardımcı olur. Mitokondriyal dinamikler, hücre döngüsü, apoptoz, hücre göçü, mitofaji ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerle bağlantılıdır (71).

Bu nedenle, mitokondriyal füzyon ve fisyon arasındaki hassas denge, hücrenin hayatta kalması ve optimal işleyişi için çok önemlidir. Mitokondriyal dinamiklerdeki kusurlar, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik durumla ilişkilidir (72, 73).

2.3 Otizm ve Mitokondri İlişkisi

Otizmin etiyopatogenezinde genetik faktörler önem taşımakla birlikte (74) pek çok otizm vakasında genetik bir neden saptanamaması hastalığın çevresel etkenlerden

de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (75). Son yıllarda yapılan çalışmalar mitokondri fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, gastrointestinal anormallikler ve immun sistemin düzenlenmesindeki bozuklukların otizmliler hastaların büyük çoğunluğunda hastalığa eşlik ettiğini göstermiştir (54). Otizmin gelişimine mitokondriyal işlev bozukluğunun eşlik ettiği ve bu nedenle otizmliler kişilerin anormal karbonhidrat metabolizmasına sahip oldukları öne sürülmüştür (76). Lombard ve arkadaşları otizmin tipik olmayan mitokondri işlevi sonucu gelişen bir rahatsızlık olarak tanımlamıştır (77). Otizmlilerde mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ) proteinlerinin miktarlarında ve fonksiyonlarında azalma olduğu ve dolayısıyla mitokondrinin fonksiyonunda bozulma olduğu gösterilmiştir. Solunum zinciri proteinlerindeki bu eksiklik çok büyük enerji gereksinimi olan beyin gibi dokularda yetersiz enerji metabolizması, serbest radikal oluşumu ile oksidatif stresin artışı ile sonuçlanmıştır (78). Son yıllarda yapılan bir araştırmada, otizmliler bireylerin beyinlerinde sağlıklı beyinlere göre mitokondri ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (78, 79). Ayrıca bu mitokondri ilişkili yolların gen ekspresyonu ile birlikte sinaps yolağı ile bağlantılı genlerin de arttığı görülmüştür. Bir başka çalışmada ise sinaptik transmisyon ve mitokondri ilişkili genlerin ekspresyonu hem otizmde hem de şizofrenide azaldığı bildirilmiştir (80).

Otizmde mitokondriyal işlev bozukluğunun varlığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının otizmin nedeni mi yoksa otizmin gelişimi sürecinde/sonucunda mı ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir.

Nörogelişimsel bir hastalık olan otizmin gelişimi sırasında etkilenen beyin bölgeleri arasındaki moleküler (mitokondri fonksiyonundaki) farklılıklar ve bu farklılıkların otizm gelişiminin hangi aşamasında ortaya çıktığı bilinmemektedir. Mitokondri fonksiyonundaki bozukluk karbonhidrat, yağ ve amino asit metabolizmasının bozulmasına, apoptozun artmasına, kalsiyum regülasyonunun bozulmasına, hormonal veya transkripsiyonal kontrolün bozulmasına, ROS üretiminin ve oksidatif stresin artmasına, immün cevabın ve bağırsak-beyin aksisinin bozulmasına neden olmaktadır.

Hücre içindeki yaşamsal öneme sahip bu yollar üzerindeki mitokondrinin etkisi dikkate alındığında ve otizmliler çocuklara mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun

üstesinden gelmek için L-karnitin, koenzim Q gibi kofaktör tedavisi ve ketojenik diyet uygulandığı için ve erken müdahale ile hücreye verilen hasar en aza indirilebileceği için, bu tez ile mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun otizm gelişiminin hangi basamağında ortaya çıktığı ve otizmin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunun açığa kavuşturulması büyük önem taşımaktadır (81). Bu tezde, otizmin gelişimsel sürecinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun belirlenmesi aşağıdaki bölümde açıklandığı gibi mitokondriyal füzyon, fizyon, mitofaji ve oksidatif stress analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

2.4 Mitokondriyal Dinamikler

Mitokondriler hücreşel şartlara bağılı olarak mikrotübüller üzerinde hareket eden oldukça dinamik organellerdir. Bu dinamikler mitokondriyal füzyon ve fizyon olarak isimlendirilen süreçlerle kontrol edilmektedir.

2.4.1 Mitokondriyal füzyon

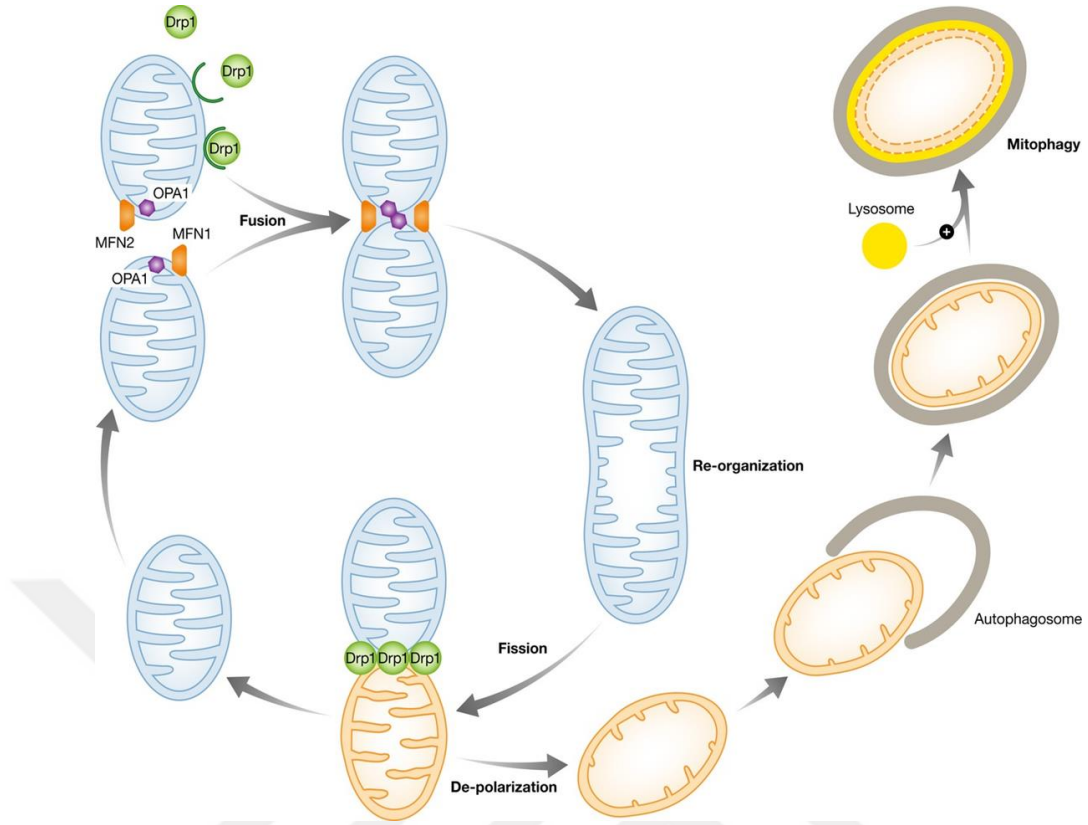
Mitokondriyal füzyon kısmen hasar görmüş mitokondrinin hasarlı kısmı ayrıldıktan sonra sağlıklı mitokondri ile birleşmesi olayıdır (82, 83). Mitokondriyal füzyon, üç zar GTPaz'ı, Mitofusin 1 (MFN1, insan kromozomu 3q26), Mitofusin 2 (MFN2, insan kromozomu 1p36) ve Optik Atrofi 1 (OPA1, insan kromozomu 3q29) proteini aracılığıyla dış ve iç zar ara yüzlerinde iki mitokondriyi birleştirir. Bu proteinler, dinamikle ilişkili protein (DRP) süper ailesinin üyeleridir. MFN 1 ve 2, *Drosophila* proteini fuzzy onion (Fzo) homologlarıdır (84). OPA1, mayada mitokondriyal füzyon için gerekli bir protein olan Mgm1'in memeli ortoloğudur (85).

Bazı mitokondriler, ROS tarafından indüklenen mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar nedeniyle solunum fonksiyonlarını en iyi şekilde yerine getiremezler (86). Bu nedenle mitokondriyal füzyon, kaynaşan mitokondriler arasında gen ürünleri ve metabolitlerin değış tokuşuna izin verdiği için hayati öneme sahiptir ve bunların genel solunum fonksiyonlarını geliştirir. Benzer şekilde mitokondriyal füzyonun engellenmesi, mitokondriyal fonksiyonun düşük performansı ile ilişkilidir (87).

2.4.2 Mitokondriyal fizyon

Fizyon ise sağlıklı mitokondrinin hasar gören parçasının ayrılmasına neden olur (88). Bu hasarlı kısım daha sonra seçici otofaji türü olan mitofaji aracılığı ile ortadan kaldırılır. Mitokondriyal fizyonda sitoplazmadan bir GTPaz olan dinamin ilişkili protein-1'in (Drp1) dış zara göçü ve dış zarda bulunan başlıca fizyon-1 ve mitokondri fizyon faktör proteinleri görev almaktadır (82, 83, 89).

Mitokondriyal fizyon hücre bölünmesini takiben mitokondrinin proliferasyonunda oldukça önemlidir (Şekil 1 ve 2). Mitokondri morfolojisinin fizyona yani parçalanmış hale geçişi çeşitli hücrelerde hücre ölümünü tetiklemektedir. Zıt olarak, birleşmiş mitokondri enerjetik olarak daha aktif bir biçimde, hücre işlevlerinin korunmasında ve hücrenin oksidatif strese daha kolay uyum göstermesinde önemlidir. Bu proteinlerde meydana gelen mutasyonlar çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Mitokondriyal fizyon hücre bölünmesini takiben mitokondrinin proliferasyonunda oldukça önemlidir. Mitokondri morfolojisinin fizyona yani parçalanmış hale geçişi çeşitli hücrelerde hücre ölümünü tetiklemektedir. Zıt olarak, birleşmiş mitokondri enerjetik olarak daha aktif bir biçimde, hücre işlevlerinin korunmasında ve hücrenin oksidatif strese daha kolay uyum göstermesinde önemlidir. Bu proteinlerde meydana gelen mutasyonlar çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Füzyon ve fizyon dengesiz bir duruma dönüşürse mitokondri fonksiyonun bozulmasına bu da metabolik hastalıkların yanı sıra nörodejeneratif hastalıkların gelişimini tetikleyebilmektedir (89).



Şekil 1. Mitokondride biriken hasar sonucu oluşan debrisler segmente edilir, mitokondriyal füzyon sonrası mitokondri hasarlı (Sarı) ve sağlıklı (Mavi) mitokondri olarak bölünür. Bölünme olayı sonrasında hasarlı mitokondri otofagozom içine alınarak mitofajiye uğrar. Mitokondriyal füzyon ise, MFN1/2 (dış mitokondriyal membranda) ile OPA1 (iç mitokondriyal membranda) ana füzyon proteinleri ve DRP1 aktivitesi ile gerçekleşir (Gao ve ark., 2014'ten alıntıdır. (90)).

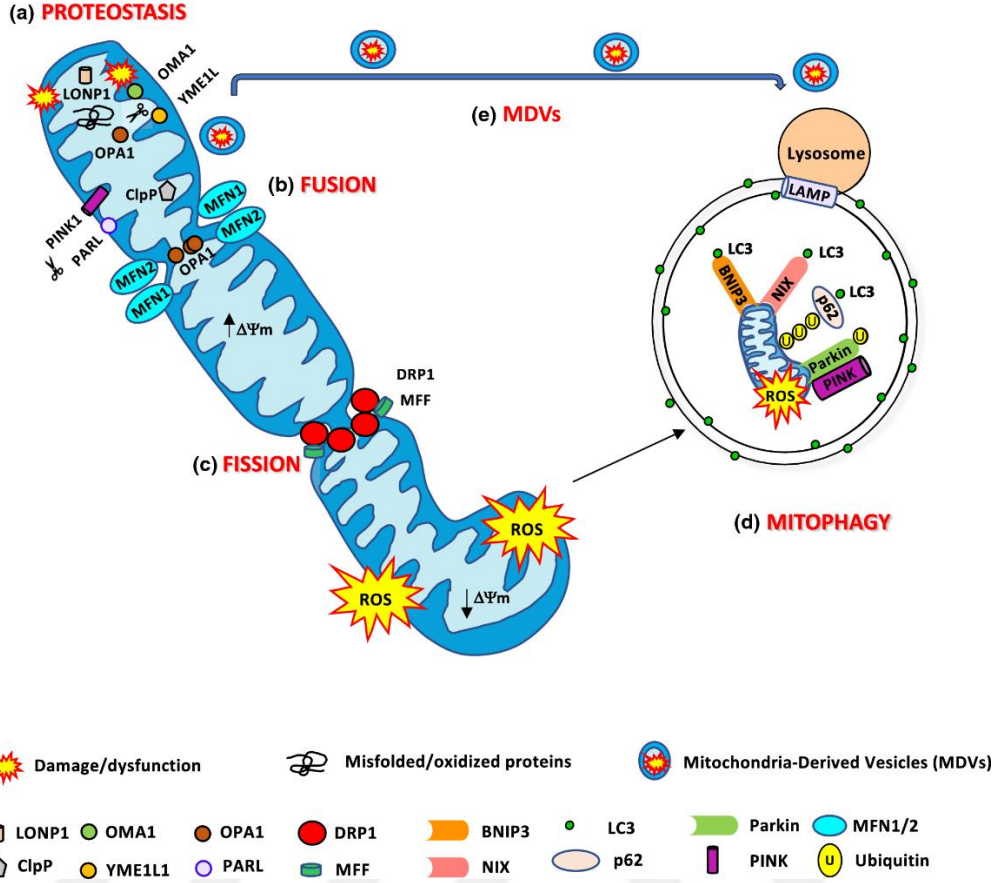
2.4.3 Mitofaji

Otofaji hücre içindeki hasarlı organel ve proteinlerin otofagozom içinde enkapsülasyon ve katabolizma sürecidir (91, 92). Otofaji, selektif olmayan ve selektif otofaji olmak üzere ikiye ayrılır; selektif olmayan otofaji hücrel enerji yetersiz olduğunda gerçekleşir ve çok çeşitli hücre içi içeriğin (proteinler, organeller, sitozol gibi) degradasyonunu içerirken, selektif otofaji (veya kargo spesifik otofaji) besin olarak zengin hücrelerde gerçekleşir ve degradasyonu gerçekleşmezse toksik olabilecek gereksiz veya hasarlı organellerin ve protein agregatlarının degradasyonunu içermektedir (93). En iyi bilinen selektif otofaji tiplerinden biri mitofajidir (93).

Hücrede zarar görmüş mitokondri ubiquitin-proteozom sistemi (UPS), füzyon ve fizyon gibi mekanizmalarla onarılmaktadır. Bu tamir mekanizmasının yetersizliği ya da başarısızlığı durumunda mitokondri parçalanmasında artış görülebilmektedir. Mitokondri dönüşümdeki kilit mekanizma ise mitokondrilerin seçici otofaji türü olan mitofajidir. Mitofaji oksidatif hasar, mitokondri membran potansiyelinin azalması, hipoksi gibi çeşitli streslerle uyarılmaktadır (94). Bu streslerin her biri farklı proteinlerin rol oynadığı proteinler aracılığı ile gerçekleşirken en önemli ortak özellik ise LC3-etkileşim bölgesi (LIR) aracılığı ile otofaji proteini LC3-II'nin bu proteinleri tanıyarak otofaji keseciğine hapsedilen mitokondriler lizozoma gönderilerek parçalanmaktadır (Şekil 2). Mitokondrilerin farklı streslere maruz kalarak mitofaji üzerinden yok edilmesi reseptör-aracılı, adaptör protein aracılığı ile ve Parkin bağımlı yollar gibi birbirinden farklı şekilde gerçekleşmektedir (95).

Reseptör-aracılı mitofaji, mitokondriyal hasar sonrası tetiklenen mitokondriyal depolarizasyon mitofaji reseptörlerinin dış mitokondriyal membran üzerinde birikmesiyle gerçekleşir (96). İntegral membran proteinleri olan bu reseptörler memeli Atg8 ailesi proteinlerinin LIR'e bağlanmasını tetikler ve mitokondrinin otofajiyeye uğrayacağı membranın oluşmasını tetikler (96). Adaptör protein aracılı mitofajide p62, optineurin, NDP52 ve TAX1BP1 gibi çeşitli adaptör proteinler mitokondrilerde bulunan ubiquitinlenmiş proteinlerle ve LC3 ile etkileşime girerek mitofajinin gerçekleşmesini sağlar (97-99) (Şekil 2). Bu tür mitofaji ubiquitin bağımlı yolla ilişkilidir.

Ubiquitin bağımlı mitofaji (veya PTEN-induced putative kinase (PINK1) bağımlı mitofaji) mitofaji ise mitofajide en çok bilinen yolak, mitokondri membran potansiyeli kaybı sonucu sitoplazmik bir protein olan PINK1 yolağı olup, PTEN'in mitokondri dış zarına yerleşimi, Parkin proteininin mitokondri dış zarına göçüne neden olur. PINK1, Parkini fosforillemesi ile Parkin proteini dış zardaki proteinlerin ubiquitinlenerek etiketlenmesini sağlar. Bu ubiquitinlenme seçici adaptör proteinlerden optineurin ve NDP52, p62'nin (p62/SQSTM1, Sequestosome 1) mitokondriye göçüne sebep olur ve bunun sonucunda p62 proteini, LIR bölgesi ile LC3-II'ye bağlanarak mitokondri otofagozom içine alınır ve parçalanmak üzere lizozoma gönderilir (95) (Şekil 2).



Şekil 2. Mitokondri kalite kontrol yolları. a. Mitokondriyal proteazlar olan LONP1, ClpP, OMA1, YME1L1 ve PARL, mitokondriyal proteazisi dengelemektedir. PARL, OMA1 ve YME1L1, mitokondriyal füzyon ve kristae yeniden modellenmesi için kritik öneme sahip olan OPA1 proteinini düzenler. PARL, mitofajiyi düzenleyen PINK1'i deegrede eder. b. MFN1/2 ve OPA1, büyük bir mitokondriyal ağ oluşturmak için mitokondriyal füzyona aracılık eder. c. DRP1 ve MFF, mitokondriyal fisyonda rol alan ana proteinlerdir. Düşük mitokondriyal membran potansiyeli sebebi ile fragmente olan mitokondri, mitofaji ile yok edilir. d. BNIP3 ve NIX, mitokondriyi otofagozoma bağlamak için LC3'e bağlanan mitofaji reseptör proteinleridir. PINK1 mitokondri depolarize yüzeyinde birikerek ubikitinlenmiş dış mitokondriyal proteinlerini ve Parkin proteininin UBL domenini fosforile eder. Parkin, dış mitokondriyal membran proteinlerinin ubikitinasyonunu daha da teşvik eder. Bunun sonucunda ubikitinlenmiş proteinler, mitofajiyi başlatmak için p62/SQSTM1 adaptör tarafından tanınır. e. Hafif mitokondriyal hasar ise mitokondriyal bileşenleri içeren mitokondriyal türevli keseciklerin (MDV'ler) lizozomda yıkıma uğraması amacı ile salınmasını aktive eder.

Bu tezde mitofaji ile ilişkili olarak *VDAC1*, *COX IV*, *Bnip3*, *PARKIN*, *PINK1*, *P62*, *LC3B* ve *OPA1* genlerinin düzeyleri qRT-PCR ile incelenmiştir. Böylelikle mitofajideki değişimin hangi yolak üzerinden olacağı aydınlatılmış olacaktır. Otizm ve mitokondri ilişkisi bölümünde de açıklandığı gibi mitokondri işlev bozukluğunun mitofaji bağlantısı ile otizmin gelişimsel sürecinde belirlenmesi otizm hakkında bilgi birikimini arttıracaktır.

Bugüne kadar mitokondri dinamikleri (fizyon/füzyon, mitofaji) ve otizm arasındaki ilişkiyi gösteren araştırmalarda gen ekspresyon düzeyi araştırılmıştır (78, 79). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada ise otizmlı bireylerden elde edilen lenfoblastoid hücre hattı model sistemi olarak kullanılmış ve mitokondri işlev bozukluğu mitokondriyal solunum üzerinden incelenmiştir (100). Bu çalışmada, bazı otizimli bireylerin mitokondriyal solunumu normal (tipik) bazı otizimli bireylerin ise mitokondriyal solunumu atipik olarak bulunmuştur. Otizimli bireylerden elde edilen lenfoblastoid hücreler uzun süre ROS'a maruz bırakılarak mitokondrideki işlev kaybının çevresel şartlara bağlı olup olmadığı da irdelenmiştir. Uzun süre ROS'a maruziyet hem atipik hem de tipik mitokondriyal solunuma sahip otizimli bireylerde mitokondriyal işlevsizliğe sebep olmuştur. Ek olarak, mitokondriyal fizyon/füzyon (*DRP1*, *MFN1*, *MFN2*) ve plastisite ile ilgili genlerin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Mitokondriyal solunumu normal olan grupta da mitokondriyal fizyon/füzyon (*DRP1*, *MFN1*, *MFN2*) ve plastisite ile ilgili genlerin mRNA ifade düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (100).

2.4.4 Mitokondri ve oksidatif stress

Mitokondri hücre içinde başlıca ROS üretim yeridir. Mitokondride ROS üretimi pekçok hastalıkta ve yaşlanmada patolojik süreçlere aracılık etmektedir. Oksidatif stresin, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde katkısı olduğu gösterilmiştir (101). Son zamanlarda otizm gibi nörogelişimsel bozukluklarda oksidatif stresin önemli bir faktör olduğunu gösteren yayınlar giderek artmaktadır (102).

Otizimde gösterilmiş olan ETZ'deki fonksiyon bozukluğu ATP üretimini kısıtlar ve bu da ROS birikiminde artışa neden olur. Mitokondrideki ROS birikimi ETZ'nin

işlevine ve membran geçirgenliğine zarar verebilir, bu da kalsiyumun geri alımı, sitokrom c salınımı ve sonunda apoptoza götürebilir (103, 104). Ayrıca ROS sitoplazmaya ve hatta hücre dışı boşluğa da salınarak ciddi organ hasarına neden olabilir. Bunun yanısıra, ROS birikimi, lipidler, proteinler ve DNA gibi hücrel yapıtaşlarında da oksidatif hasara yol açabilir. Hasarlı DNA'nın replikasyonu genetik mutasyonlara ya da apoptoza neden olabilir (105, 106).

Bu bağlamda, otizmin gelişimsel sürecinde mitokondriden süperoksit salınım analizi yapılarak oksidatif stres ölçülmüştür.

2.4.5 Mitokondriyal dinamikler ve nörodejeneratif hastalıklar

Mitokondriyal dinamik süreçlerdeki bozulma, anormal mitokondriyal morfoloji ve aktiviteye yol açabilir. Mitokondriyal morfoloji disfonksiyonu olan hücrelerin solunum ve biyoenerjetik yetenekleri azalmıştır (107). Yüksek düzeyde patojenik mitokondriyal DNA birikimi olduğunda bu tür biyoenerjetik işlevler tamamen kaybolur. Mitokondriyal DNA'nın dağılımı, kısmen mitokondriyal füzyon ve bölünme ile kontrol edilir. Ek olarak, aşırı derecede parçalanmış mitokondriye sahip hücrelerde elektron taşıma zincirinden ATP üretimi ve mitokondriyal membran potansiyeli azalır. Drp1-Ser616'nın Cdk1/Siklin B tarafından fosforilasyonu sonucunda ise mitokondriyal bölünmeye neden olarak mitokondrilerin bölünme sonrası hücrelere aktarılmasını sağlar (108). Bunun yanında, Drp1-Ser637'nin protein kinaz A PKA tarafından fosforillenmesi, Drp1-Ser616'nın Cdk1/Siklin B tarafından fosforilasyonuna kıyasla daha verimli mitofajiyi sağlarken ve PINK1/Parkin yolu aracılığıyla mitokondriyal fisyonuna sebep olarak mitozda aynı anda multipolar iğ oluşumuna sebep olur (108). Fosfo-Drp1(Ser616)'in aşırı aktivasyonu sonucu mitokondriyal parçalanma artar, kas büyümesini azalır ve büyüme hormonu yolağı değişirken aynı zamanda bu hücrelerde mitokondriyal DNA da azalır (109).

Bununla birlikte, dengesiz miktarlarda füzyon ve fisyon, farklı mitokondriyal morfolojilere, işleve ve dağılıma yol açar. Nöronal fonksiyon yüksek düzeyde mitokondriyal metabolizma gerektirdiğinden, mitokondride fonksiyonel veya morfolojik değişiklikler nöronlarda ciddi sonuçlara yol açabilir. Farklı uyarılar füzyon ve bölünmeyi teşvik eder; Fisyon, füzyon üzerinden arttırıldığında, mitokondri

parçalanır ve nöronal hasara katkıda bulunabilir. Mitokondriyal dinamiklerdeki değişiklikler, organeller arası iletişimi ve mitokondriyal kaybı ve kalite kontrolünü potansiyel olarak değiştirerek nörodejenerasyona yol açabilir (110). Mitokondriyal ağ parçalanması engellendiğinde, aksonlarda ve dendritlerde bu vazgeçilmez organelin eksikliğine ve sinaps aktivitesinin ve oluşumunun değişmesine neden olan ekstra uzun mitokondriler üretilir. Nöronlarda mitokondriyal parçalanma, mitokondrinin dendritik dikenlere yeniden dağıtılmasını sağlar (111). Mitokondriyal fisyon ve füzyonda görevli proteinlerde oluşan çeşitli mutasyonlar çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal ağda bozulmalara sebep olur. Örneğin insanlarda MFN2 proteininde meydana gelen mutasyon mitokondri fragmentasyonuna sebep olup Charcot-Marie-Tooth (CMT) tip IIA'ya sebep olur (112, 113). OPA1'de meydana gelen mutasyon benzer şekilde fragmente mitokondriye sebep olarak otosomal dominant optik atrofiye yol açar (114). DRP1 aktivitesindeki artış da mitokondriyal fisyonuna sebep olarak PH'de dopaminerjik nörodejenerasyona (115, 116), AH'de yaygın nörodejenerasyona (117) ve Huntington hastalığında bazal ganglia ve serebral kortekste nörodejenerasyona sebep olur (118).

Mitokondriyal dinamikleri ve parçalanmayı anlamamanın önemi, nörodejeneratif hastalıklarda bunların tanımlanmasında gösterilmektedir. Periferik nöropati (CMT) tip IIA'nın bir formu, Mfn2'deki mutasyonlardan kaynaklanır (110). Bu, mitokondriyal dağılımda, mitokondrinin sinir terminallerine iletilmediği ve küçük kalibreli aksonlarda mitokondrinin birikmesiyle sonuçlanan değişikliklere yol açar (107, 119).

CMT tip IVA'nın farklı bir formundaki başka bir mutasyona uğramış protein, dış mitokondrideki işlevi fisyon ile ilişkili olan gangliosid kaynaklı farklılaşma ile ilişkili protein 1'dir (GDAP1). Mutasyona uğradığında veya aşırı eksprese edildiğinde mitokondriyal parçalanmaya yol açar (107, 120). Buna karşılık, diğer bozukluklarda, mitokondriyal dinamiklerin anormallikleri, birincil kusurun altında ikincil fenomenler olarak ortaya çıkar. Kültürlenmiş AH nöronlarının ve piramidal hasta nöronlarının nöritlerinde, ilerleyici mitokondriyal parçalanma göstermiştir (120, 121). MFN'lerin ve OPA1'in ifadesinin artması ve Drp1'in ifadesinin azalması da amiloid ekspresyonu olan nöronlarda meydana gelir (110). Ek olarak, Drp1 ve amiloid arasındaki etkileşimler zamanla ilerler ve mitokondriyal parçalanma miktarıyla korelasyon

gösterir (110, 122). Drp1, amiloid ile etkileşime girerek mitokondriyal fisyonu artan bir oranda destekleyebilir (121).

PH mitokondriyal parçalanmanın da meydana gelebileceği başka bir nörodejeneratif hastalıktır. α -syn (otozomal dominant), LRRK2 (otozomal dominant), PINK2 (otozomal resesif) veya parkin (otozomal resesif) mutasyonları tarafından kodlanan PH'nın genetik formları, hastalıkta mitokondriyal dinamiklerin rolüne dair ipuçları sağlar. Örneğin, LRRK2 Drp1'i fosforile ederek aktivitesinde bir artışa yol açar (123, 124) ve sporadik Parkinson hastası periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) numunelerinde (Ser616) fosfo-Drp1'de bir artış gösterir (83, 110).

2.5 Otizm Hayvan Modelleri

Otizmin patolojisini, oluşumunda rol alan patofizyolojik süreçleri, davranış değişikliklerini, tanı ve tedavisini araştırmak için çok çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu otizm modellerinin arasında primatlar, evcil hayvanlar, kemirgenler, kuşlar, balıklar ve omurgasızlar bulunmaktadır (125).

Hayvan modeli olarak maymunlar insan sosyal davranışını en iyi şekilde simüle eden modellerdir. Yetmiş milyon yıldan fazla bir süredir evrimleşen kemirgenlere kıyasla makakların evrimsel olarak insanlardan ayrılması yaklaşık 25 milyon yıl önce gerçekleşmiş olup ve genetik, nörobiyoloji ve davranış açısından insanlara daha fazla benzerlik göstermektedir (126, 127). Maymunlarda geliştirilen çeşitli genetik ve farmakolojik otizm modelleri mevcuttur (128). Maymunlara ek olarak köpek modellerinin de otizm araştırmalarında yararlı olabileceği belirtilmiştir (129). Zebra balığı (*Danio rerio*) sosyal davranışı iyi karakterize edilmiş ve genetik zebra balığı otizm modellerinde uygulanabilecek ve yaygın bir şekilde lokomotor aktivite testleri olması sebebiyle yararlı bir modeldir (130, 131). Zebra balığında otizm için genetik ve genetik olmayan çeşitli modeller bulunmaktadır (132). Benzer şekilde *Drosophila melanogaster* otizm ilişkili sendromlarda sinaptik fonksiyon ve nöral devrelerin araştırılmasında iyi bir genetik araçtır (133). Kemirgenler, insanlara nöroanatomik, elektrofizyolojik, biyokimyasal ve genetik benzerliği sebebiyle otizm araştırmalarında oldukça fazla kullanılmaktadır ve çok çeşitli otizm modelleri bulunmaktadır (125).

2.5.1 Genetik otizm modelleri

Otizme ilişkili olan yüzlerce gen bildirilmiştir (134). Klasik sendromik otizm genleri *MECP2*, *FMR1*, *SHANK3*, *TSC1/2* ve kromozom 15q11–q13 duplikasyonunu içermektedir (134).

MECP2 geninde meydana gelen mutasyon, insidansı 1/10000-15000 arasında değişen, zekâ geriliğine neden olan ilerleyici bir nörogelişimsel bozukluk olan Rett sendromunun (RTT) ana sebebidir (134). RTT, tekrarlayan hareketler, bozulmuş motor koordinasyon ve sosyal geri çekilme gibi ortak klinik semptomları göz önüne alındığında sıklıkla OSB içinde sınıflandırılmaktadır (134). Sıçan modellerinde *Mecp2* geninin delesyonu büyüme geriliği, maloklüzyon, egzersiz eksikliği, zayıf ön ayak tutuşu ve ciddi sosyal iletişim sorunlarına sebep olmaktadır (135). *MECP2*'nin fare modelleri ise bozulmuş sosyal davranış da dahil olmak üzere RTT semptomlarını taklit etmektedir (136-139).

Frajil X sendromu (FXS), temel olarak, fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) geninin 5'UTR ucundaki CGG trinükleotidinin aşırı genişlemesiyle ortaya çıkar ve küçük bir kısmı *FMR1* geninin nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (140). *MECP2*'ye benzer şekilde, *FMR1* de otizmin başka bir monogenik nedeni olarak kabul edilmektedir. *In vivo* iki fotonlu kalsiyum görüntüleme deneyler *Fmr1* nakavt farelerdeki nöronların tekrarlanan bıyık stimülasyonuna uyarlanabilirliğinin azaldığını göstermiştir, bu da kortikal duyu devresindeki adaptif bozulmanın otizmin dokusal savunmasının potansiyel bir nedeni olabileceğini düşündürmektedir (141).

SH3 ve multiple ankirin repeat domains protein 3 (*SHANK3*), çeşitli iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri ile etkileşime giren ve aktin hücre iskeleti ile ilişkili olan bir postsinaptik yoğunluk proteindir. *SHANK3* mutasyonu, otizm ve Phelan-McDermid sendromu ile ilişkili olup, Phelan-McDermid sendromu global zekâ geriliği, zihinsel engel, konuşma gecikmesi veya kaybı ve hafif deformitelerle karakterizedir (142, 143). *Shank3* nakavt farelerde, mutant farelerdeki korteks-striatum-talamik döngü aşırı aktif olup ve bu da sosyal davranışların bozulmasına yol açmaktadır (144). *Shank3* nakavt farelerde *Shank3* ifadesinin erken geri döndürülmesi ise otizm benzeri davranış fenotipini önleyebilmektedir (145).

Tüberoskleroz kompleksi (TSC), birden fazla organda yumru benzeri iyi huylu tümörler ile karakterize otozomal dominant bir hastalık olup genellikle otizmin eşlik ettiği kötü huylu tümörlere dönüşebilmektedir (146). Fare modellerinde, Purkinje hücrelerinde *Tsc1* veya *Tsc2*'nin spesifik olarak silinmesi sonucunda, fareler, bozulmuş hafıza, tekrarlayan davranışlar ve çıkarılan seslerde değişim de dahil olmak üzere çeşitli otizm benzeri davranış sergilemektedir (147, 148).

Otizmin bilinen nedenleri arasında, büyük tekrar dizileri içeren insan kromozomu 15q11-q13'ün duplikasyonu, en sık otizmle ilişkili sitogenetik anormalliktir. Bu bölgenin bozulması otizm, Angelman sendromu ve Prader-Willi sendromu gibi farklı rahatsızlıklara yol açmaktadır (149). Kromozom 15q11-q13 duplikasyonu otizmin %3 kadarında görülürken bir E3 ubiquitin ligaz olan UBE3A'nın seviyelerinde genellikle artış görülür (150, 151). Farelerde, aşırı UBE3A ifade edildiğinde otizm benzeri davranışlar indüklenebilmekte ve bu da retinoik asit aracılı nöronal homeostatik sinaptik plastisitenin bozulmasına neden olmaktadır (152). UBE3A, retinoik asit sentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan ALDH1A2'yi regüle edebilir ve ALDH1A antagonistinin uygulanması, otizm ile ilişkili bozulmuş sosyal davranışların düzelmesini sağlar (152).

Sendromik olmayan otizm genleri *NLGN*'ler, *NRXN*'ler, *CHD8*, *POGZ*, *ANK2*, 1p21.3 mikrolelesyonu (*MIR137*) ve 16p11.2 mikrolelesyonu ve duplikasyonunu içermektedir (125).

Nöroliginler (*NLGN*'ler), postsinaptik zar üzerindeki hücre adhezyon molekülleridir ve presinaptik ve postsinaptik nöronları birbirine bağlarlar (153). Hayvan modelleri, *NLGN* gen nakavtının beyindeki nörotransmitterlerde sinaptik değişikliklere ve anormalliklere neden olabileceğini, bunun da otizmin semptomlarının ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşündürmektedir (154). *NLGN* nakavt veya mutant farelerde yapılan çalışmalar çeşitli otizm benzeri semptomlar gözlemlenmiştir (155-159).

Nöreksinler (*NRXN*'ler), *NLGN*'nin presinaptik bağlayıcı ligandıdır ve sinaptik adhezyon, farklılaşma ve olgunlaşmada önemli roller oynar (160). Kontaktin ile ilişkili protein benzeri 2 proteini kodlayan *CNTNAP2*, neurexin ailesinin bir üyesidir (161).

Sıçanlarda *Cntnap2* yokluğu, sosyal etkileşimde, stereotipik davranışta ve duyuşal davranışta değişikliklere yol açmaktadır (162).

Kromodomain helikaz DNA bağlayıcı protein 8 (CHD8) epigenetik ve transkriptomik düzenlemeyi kontrol etmekte olup birçok otizm risk geninin ana düzenleyicisi olarak görev yapar (163). Farelerde CHD8 ortolog silinmesi, beyin ağırlılığını ve hacmini arttırdığı gözlemlenirken ve zebra balığında, CHD8 mutasyonları olan otizm hastalarında görülen makrosefaliyle tutarlı olarak makrosefali ile sonuçlanmaktadır (164-167). İnsan CDH8 mutasyonunu taklit eden heterozigot *Cdh8* mutasyonu erkek farelerde anormal otizm benzeri davranışa sebep olmaktadır (168).

Pogo transposable element derived with ZNF domain (POGZ) beyin de dahil olmak üzere insan dokularında yaygın olarak ifade edilmektedir. POGZ, otizmde rol oynayan bazı genlerin kromatin düzenleyicilerinden biridir (43, 169). Heterozigot *de novo Pogz* mutasyonuna sahip fareler de otizm benzeri anormaliler ve anksiyete ilişkili kaçınmada azalma gözlenmiştir (170, 171). Bunun yanında farelerde sinir sistemine özgü *Pogz* delesyonu, mikrosefali, gelişimde bozulma ve çeşitli insan semptomlarını taklit eden otizm benzeri davranışlara yol açmaktadır (169).

ANK2, ankirin gen ailesinin bir üyesidir ve 440 kDa'lık bir polipeptit olan dev ankB'nin işlevsizliği, kalıtsal iletişimsel ve sosyal davranışlarda bozulmanın yanı sıra üst yürütme işlevlerinde de bozulmaya yol açar (172).

Kromozom 1p21.3 mikrolelesyon taşıyıcılarından çoğunun (12 hastadan 11'i) otizme sahip olduğu ve hepsinin zihinsel engelli olduğu gösterilmiştir (173-175). Homozigot fareler germline nakavt ve sinir sistemi spesifik *miR-137* nakavt farelerde postnatal ölüm gözlemlenirken heterozigot fareler yaşayabilmektedir, bu da tüm kromozom 1p21.3 mikrolelesyon taşıyıcılarının hemizigot olduğunu göstermektedir (176). Heterozigot germline nakavt ve sinir sistemi spesifik *miR-137*'nin kısmi kaybı, otizm ile ilgili sinaptik aşırı büyüme ve bozulmuş sinaptik plastisiteye ve ayrıca tekrarlayan davranışlar, öğrenme ve sosyal davranışlarda bozulmaya neden olmaktadır (176).

Otizm vakalarının %1'ini oluşturan 16p11.2'de (29 gen içerir) mikrolelesyon ve mikroduplikasyonlar otizm ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (177). 16p11.2 eksikliği olan fareler, azalmış prefrontal bağlantı, talamo-prefrontal bağlantılarında hatalar ve düşük uzun menzilli fonksiyonel senkronizasyon gösterirler (178).

2.5.2 Çevresel faktörlerle indüklenmiş otizm modelleri

Çevresel faktörler de otizm etiolojisinde önemli etkiye sahip olabilir (179, 180). Propiyonik asit (181), bisfenol A (182, 183), sevofluran (184, 185) ve VPA (186) hayvanlarda otizm indüklenmesinde kullanılan kimyasallardır.

Birçok çalışma, hamile kadınlarda maternal immün aktivasyonun (MIA) fetal gelişimde önemli hasara neden olabileceğini göstermiştir. Hamilelik sırasında maternal immünoglobulin G (IgG) plasenta yoluyla fetüse pasif bağışıklık sağlayabilir, ancak koruyucu ve patojenik antikorlar aynı şekilde fetüse taşınmaktadır (187). Bu durum da hamilelik sırasında otoimmün hastalık ya da antijen varlığında fetüsün zarar görüp konjenital gelişimsel hastalık oluşumuna yol açabilir (187, 188). "Otistik çocukların anneleri" ve "normal çocukların anneleri"nden beyine reaktif IgG enjekte edilen fareler karşılaştırıldığında, "otistik çocukların annelerinden" gelen IgG antikorlarına maruz kalan yavrularda duyuusal bozulma ve artan kaygı görülmüştür (189).

Borna hastalığı virüsü (BDV) yaygın olarak bulunan, segmental olmayan, sitolitik olmayan nörotrofik, tek sarmallı bir RNA virüsüdür (190). Hayvan enfeksiyonlarında BDV, merkezi sinir sisteminde kalarak beyin hücresi fonksiyonlarında, nörogelişimsel anormalliklerde ve davranış bozukluklarında yol açar (190). BDV ile indüklenmiş sıçan otizm modellerinde, enfekte genç sıçanlar, bozulmuş duyuusal, motor, sosyal, duyuusal ve bilişsel işlevleri de içerecek üzere çeşitli davranışsal işlev bozuklukları sergiler (191).

Bağırsak mikrobiyomu da otizde görülen belirli davranışları da etkileyebilen bir başka önemli varyasyon kaynağıdır (192). Bağırsak mikrobiyom nakil deneyleri, otizm hastalarında bağırsak mikrobiyom bariz otizm benzeri davranışları indüklemek için yeterli olduğunu doğrulamıştır (193).

2.6 Valproik Asit (VPA)

VPA ile otizm insidansı arasındaki ilişki ilk kez fetal valproat sendromu tanısı konulan çocuklarda otistik semptomların görülmesi üzerine kurulmuştur (33). VPA antiepileptik ve duygudurum düzenleyici olarak kullanılan kısa zincirli bir yağ asitidir (194, 195). Yüksek teratojeniteye sahip bir ajan olan VPA halen gebe kadınlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (196). Rasalam ve arkadaşları gebelikte antiepileptik ilaçların kullanılmasının uzun dönem etkilerini inceledikleri bir çalışmada, VPA'nın %8,9 oranında otizme neden olduğunu göstermişlerdir (197). Diğer bir klinik çalışmada gebelikte VPA monoterapisinin otizm insidansını 7 kat artırdığı saptanmıştır (198). VPA'nın otistik davranışlara yol açma mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Prenatal VPA'ya maruziyetin embriyonal fare beyinde H3 ve H4 histonlarının geçici hiperasetilasyona neden olduğu gösterilmiş ve bunun postnatal otistik davranışlarla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (199, 200).

Buna göre embriyonik beyin gelişiminin kritik bir döneminde histon deasetilaz aktivitesinin inhibisyonu otizmin patogenezinde yer almaktadır. Bunun yanı sıra, VPA'nın oksidatif strese yol açabileceği (201), nöral gelişim sürecini bozarak eksitator/inhibitör dengede glutamaterjik nöronlar lehine bir kaymaya neden olabileceği (202, 203), beyin serotonin düzeylerini artırabileceği gösterilmiştir (204). Tüm bu mekanizmaların otizm patogenezinde rol oynaması olası görülmektedir. Prenatal dönemde VPA'ya maruz kalan deney hayvanlarının da otizmde görülen davranışsal semptomları gösterdiği ilk kez Rodier ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (32).

O zamandan bu yana VPA modeli otistik davranışların nörobiyolojisini aydınlatmak ve olası terapötik ajanların etkinliğini denemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kemirgenlerde tek doz prenatal VPA enjeksiyonunun otizmin ana semptomlarının yaşam boyu sürdüğü bir tabloya yol açtığı bir dizi davranışsal ve bilişsel test bataryası ile gösterilmiştir (4, 199, 205, 206).

Mabunga ve arkadaşları, VPA ile oluşturulan otizm modelinin geçerliliğini görünüşsel (semptomatik), yapısal (modelin hastalıktaki nörobiyolojik değişiklikleri ve patolojiyi taklit etmesi) ve öngörülse (etkisi bilinen bir ilacın etkisini ne derecede

yansıttığı) açılardan değerlendirmiştir (207). VPA modeline bağlı gelişen patolojik yolların insandakine en azından teorik olarak benzemesi modelin yapısal geçerliliğini ortaya koymaktadır (207). VPA modeli otizmin iki ana semptomunu (sosyal etkileşim ve iletişim sorunları, kısıtlı/tekrarlayıcı hareketler) ve otizme eşlik eden diğer bulguları başarıyla ortaya çıkartması yönüyle güçlü semptomatik geçerliliğe sahiptir. Bu tezde, otizmin gelişimsel süreçteki (Postnatal 21 ve 50. günler) mitokondriyal dinamiklerinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak için VPA ile sıçanlarda otizm modeli oluşturulmuştur.



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Sıçanlarda Otizm Modelinin ve Deney Gruplarının Oluşturulması

3.1.1 Deney hayvanları temini

Bu çalışmada hayvanlar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (DEHAM) temin edildi. Çalışma için 10 adet (250-300 gr) gebe sıçan kullanılması planlandı. Çalışmanın yapılabilmesi için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) 08.07.2020 tarihli ACU-HADYEK 2020/41 sayılı karar ile etik kurul izni alındı. Sıçanlara yapılan tüm uygulamalar National Institutes of Health (NIH) tarafından hazırlanmış laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım rehberine uygun olarak gerçekleştirildi.

Bu projede sıçanlarda VPA enjeksiyonu ile otizm modeli oluşturulmuştur.

Gebelik tayini: Sıçanların gebelik tayini için günde iki kez vajinal tıpa/plak kontrolü yapılmış ve tıpa oluşumu gözlemlenmeyen hayvanlarda vajinal smear uygulaması yapılmış, smear bakısında sperm görüntülenen anneler gebe kabul edilmiştir (207).

Bu yöntemde, Sprague Dawley gebe sıçanlara (n=10) gebeliğin 12,5. gününde 600 mg/kg VPA, 1 mL/kg %0,9'luk NaCl serum fizyolojik içinde çözülerek tek doz intraperitoneal olarak uygulanmıştır (208, 209). Kontrol grubundaki gebe sıçanlara ise gebeliğin 12,5. gününde intraperitoneal %0,9'luk NaCl serum fizyolojik enjeksiyonu (1 ml/kg) yapılmıştır.

Tüm sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık siklusta, sabit 21-22°C sıcaklık ve %45-65 nem içeren bireysel havalandırılmalı kafeslerde barındırılmış, su ve yem alımları serbest bırakılmıştır.

3.1.2 Deney gruplarının oluşturulması

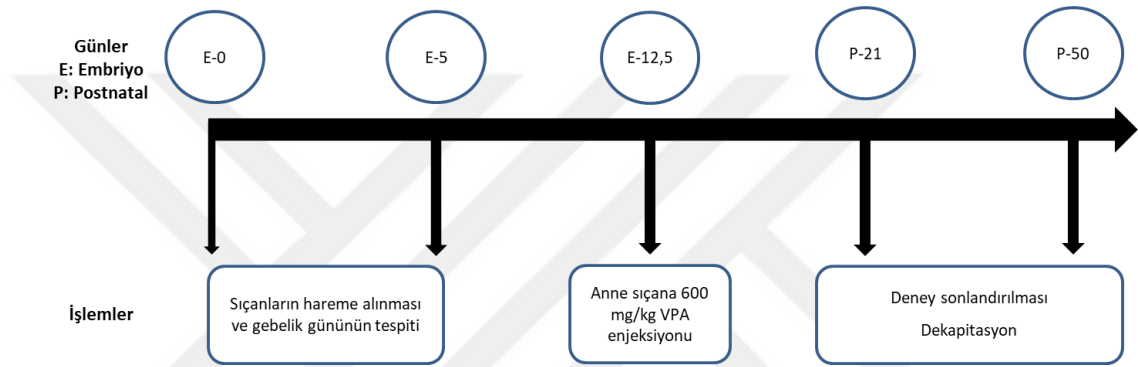
Otizmin prenatal ve postnatal gelişim sürecinde mitokondriyal fonksiyonları aydınlatmak için, gebe annelere VPA enjeksiyonundan sonra **Şekil 3**'te belirtilen zaman noktalarında prenatal ve postnatal yavrular sakrifiye edilerek kan ve beynin

prefrontal korteksleri toplanmıştır. Aynı işlem %0,9'luk NaCl serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubundaki gebe annelere de uygulanmıştır.

3.1.2.1 Zaman noktaları

Postnatal 21. gün (P21): İnsanlarda yaklaşık 2 yaşa karşılık gelen ve otizm semptomlarının fark edilmeye başlandığı dönemde (210) görülen moleküler değişiklikleri saptamak,

Postnatal 50. gün (P50): İleri çocukluk döneminde otizme bağlı moleküler ve bilişsel/davranışsal değişiklikleri saptamak



Şekil 3. Deney süreci

3.1.2.2 Kontrol grubu

Bu gruptaki yavruların gebe annelerine (n=10) embriyonik 12.5. günde (E12,5) intraperitoneal %0,9'luk NaCl serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmış ve yavrular P21 ve P50 zaman noktalarında dekapite edilmişlerdir. P21 grubu cinsiyet gözetmeksizin 7 sıçandan, P50 grubu ise en az 7 dişi ve 7 erkek olacak şekilde 14 sıçan ile oluşturulmuştur. P21 gruplarındaki yavrulara dekapitasyon öncesi herhangi bir işlem uygulanmamıştır. P50 grubu yavrular P36'dan itibaren bir bilişsel/davranışsal test bataryasına (3.2. *Bilişsel/davranışsal testler* başlığında anlatılmıştır) tabi tutulmuşlar ve P50'de dekapite edilmişlerdir.

3.1.2.3 Vpa grubu

Bu gruptaki yavruların gebe annelerine (n=10) embriyonik 12,5. günde (E12,5) VPA enjeksiyonu yapılmış ve yavrular P21 ve P50 zaman noktalarında dekapite

edilmişlerdir. P21 gruplarındaki yavrulara dekapitasyon öncesi herhangi bir işlem uygulanmamıştır. P50 grubu yavrulara P36'dan itibaren bir bilişsel/davranışsal test bataryasına (3.2. *Bilişsel/davranışsal testler* başlığında anlatılmıştır) tabi tutulmuşlar ve P50'de dekapite edilmişlerdir.

Her deney grubunda Şekil 1'de gösterilen zaman noktalarında dekapitasyon gerçekleştirilmiştir. P21 grubu cinsiyet gözetmeksizin 7 sıçandan, P50 grubu ise en az 7 dişi ve 7 erkek olacak şekilde 14 sıçan ile oluşturulmuştur. Otizm sıklığının erkeklerde dişilere göre daha fazla görülmesi nedeniyle çalışmalarda sıklıkla erkek sıçanların kullanılmasına karşın her iki cinsiyetteki yavruların davranışlarının değerlendirildiği yayınlar da bulunmaktadır (211).

Gruplar arasında yapılacak karşılaştırmalarda standardı sağlayabilmek açısından P50 grubunda bu prensip benimsenmiştir. Nitekim VPA ile otizm modeli oluşturulan deney hayvanlarında cinsiyet farklılıklarını araştıran çalışmalarda, VPA'ya bağlı gelişen immün değişikliklerin (212), stresörlere karşı kortikosteron yanıtının (213) ve gen ekspresyonunun (214) erkek ve dişi deney hayvanlarında farklı olduğu gösterilmiştir. Öte yandan sosyallikte azalma, tekrarlayıcı davranışlarda artma ve anksiyete bulguları erkek yavrularda görülürken dişi yavrularda görülmemektedir (202, 212).

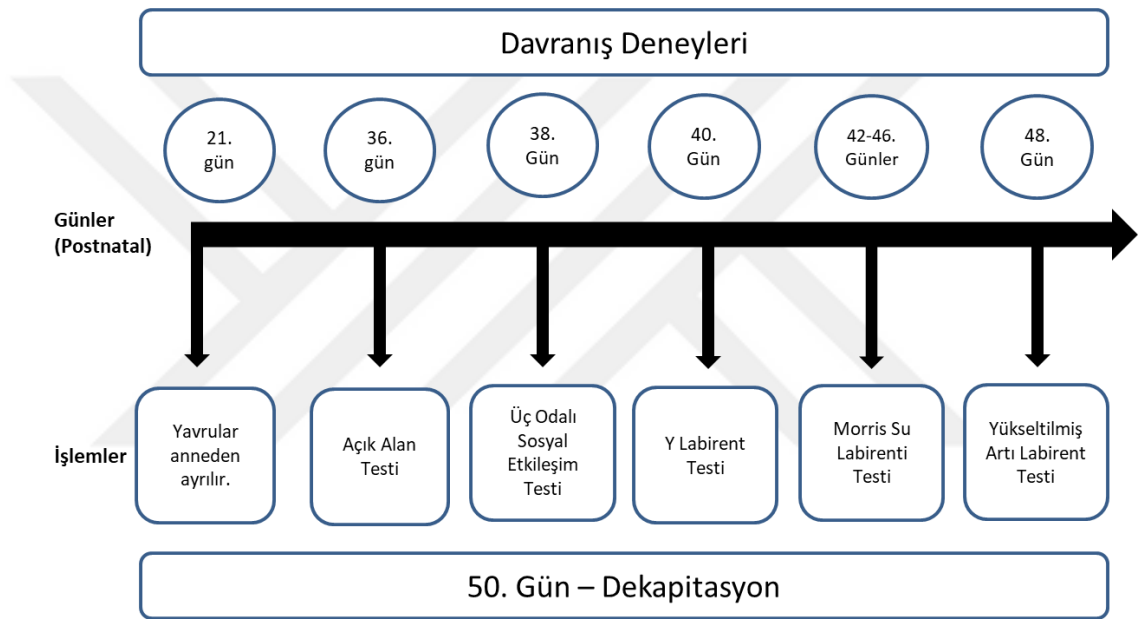
Bu nedenle, P50 grubu, her grupta en az 7 dişi ve 7 erkek yavru olacak şekilde oluşturulmuş ve P50 grubundaki tüm analiz sonuçları cinsiyete bağlı değişiklik olup olmadığı yönünden istatistiksel olarak değerlendirilmiş, anlamlı fark bulunmaması durumunda birleştirilmiştir.

3.2 Bilişsel/Davranışsal Testler

Davranış çalışmalarında test bataryası adı altında bir seri davranış testinin ardışık olarak uygulanması yaygın bir uygulamadır (215-217). Bu uygulamada temel prensip testlerin hayvanda en az stres yaratan testten en fazla stres yaratan teste doğru sıralanması ve testler arasında hayvanın normal koşullarına döndüğü bir zaman bırakılmasıdır. Bu prensibe uygun olarak testler aşağıdaki şemada belirtilen sırada ve

günlerde yapılmış ve literatür ile uyumlu olarak her test arasında en az 48 saat bulunmasına özen gösterilmiştir (218, 219) (Şekil 4).

Sirkadiyen ritmin gruplar arasında farklılık yaratmasını önlemek için tüm gruplar testlere günün aynı saatlerinde alınmıştır. Testlerin hepsi sıçanların aydınlık döneminde gerçekleştirilmiştir. Tüm testlerde her sıçan sonrasında ortam %70'lik etanol ile temizlenerek koku işaretleri ortadan kaldırılmıştır. Testler tavana monte edilmiş kameralar aracılığıyla kayıt altına alınmış ve Ethovision XT sistemi ile analiz edilmiştir.



Şekil 4. Davranış deneyleri şeması.

3.2.1 Açık alan testi

Açık alan testi sıçanların lokomotor aktivitelerini, çevreyi keşfetme ve kendini temizleme davranışlarını gözlemlemek için sıklıkla kullanılan bir testtir. VPA ile otizm oluşturulan kemirgenlerde hiperaktivite ve çevreye karşı ilginin azalması sık gözlenen bulgulardır (205). Kendini temizleme ve yalama davranışında artış da otizmin temel bulgularından biri olan tekrarlayıcı davranışlarda artmaya karşılık gelen ve bu modelde görülen davranışlardandır (217, 220).

Testin uygulanması: Sıçanlar tek tek 80X80X50 cm boyutlarında, zemini karelere ayrılmış siyah pleksiğlas kutuya belirli bir köşeden bırakılarak 5 dakika boyunca takip edilmiştir. Lokomotor aktiviteyi belirlemek için geçilen kare sayısı ve katedilen toplam yol parametreleri değerlendirilmiştir.

3.2.2 Üç odalı sosyal etkileşim testi

Otizmin temel bulgularından biri olan sosyal etkileşim ve iletişim yetersizliğini test etmek için kullanılır. VPA modelinde sosyal etkileşim ve iletişimin bozulduğu bu test ile gösterilmiştir (200, 206, 217). Aralarında giyotin kapıların bulunduğu üç bölmeden oluşan pleksiğlas bir kutudur. Sağ ve sol bölmelerde yabancı sıçanların konulacağı küçük kafesler yer alır.

Testin uygulanması: Test üç oturumdan oluşmaktadır. Birinci oturumda sıçan merkez bölmeye bırakılarak 5 dakika ortama alışmasına izin verilmiştir (alışma oturumu). Bu oturumda diğer bölmelere ulaşım giyotin kapılar kapatılarak engellenmiştir. Beş dakikanın sonunda test sıçanına tamamen yabancı, yaş ve cinsiyet uyumlu bir başka sıçan rasgele olarak sağ veya sol bölmedeki küçük kafesin içine konulmuş ve iki kapı da açılmıştır. Girişkenliğin test edildiği bu oturum 10 dakika sürmüştür ve yabancı sıçanın bulunduğu bölgede ve kafesin çevresinde geçirdiği zaman kaydedilmiştir. Hemen ardından sosyal tercihin değerlendirileceği üçüncü oturuma geçilmiştir. Bu oturumda önce test sıçanı merkez bölmedeyken kapılar kapatılmış, ardından başka bir yabancı sıçan diğer taraftaki bölmenin içindeki kafese konulmuştur. Kapılar açıldıktan sonra 10 dakika süreyle test sıçanının her üç bölmede de geçirdiği zaman kaydedilmiştir. Girişkenlik indeksi (GİN) ve sosyal tercih indeksi (STİ) aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (217).

GİN: Yabancı sıçanın bulunduğu bölmede geçirilen zaman / Boş bölmede geçirilen zaman.

STİ: İkinci yabancı sıçanın bulunduğu bölmede geçirilen zaman / İlk yabancı (tanıdık) sıçanın bulunduğu bölgede geçirilen zaman.

3.2.3 Y labirent testi

Otizmin ana semptomlarından biri olan tekrarlayıcı davranışı test etmek için kullanılan diğer bir yöntemdir. Aynı zamanda çalışan bellek değerlendirmek için de kullanılır. Labirent Y şeklinde 3 koldan oluşur. Kemirgenlerin içgüdüsel olarak yeni yerleri keşfetme isteğine dayanan bir testtir. Normal bir hayvanın birbirini tekrar etmeden üç kolu ardışık olarak ziyaret etmesi spontan değişim davranışı (spontaneous alternation behavior) olarak tanımlanır. Üçlü ardışık ziyaret sayısının azalması çalışan bellekte bir sorun olduğu ya da tekrarlayıcı davranışların artması şeklinde yorumlanır.

Testin uygulanması: Sıçan 3 kolun birleştiği alana bırakılarak 5 dakika boyunca hareketleri kaydedilmiştir. Sıçanın herhangi bir kola girmiş sayılabilmesi için dört ekstremitesinin de o kolda olmasına dikkat edilmiştir.

Ardışık üç kolun ziyareti sayılacak ve spontan değişim davranışı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Spontan değişim davranışı = ((Ardışık üç kol ziyareti sayısı / (Toplam ziyaret edilen kol sayısı - 2)) x 100

3.2.4 Morris su labirenti testi

Otizimde mekansal bellekteki değişiklikler konusunda çelişkili yayınlar bulunmaktadır (6, 221). VPA modelinde mekânsal öğrenme belleğin değerlendirilmesinde en sık kullanılan testlerden biridir (222). Su dolu bir havuza bırakılan fare ya da sıçanın suyun 2 cm altında bulunan gizli bir platformu tekrarlayan denemelerde çevresel ipuçlarına dayanarak bulmayı öğrenmesi prensibine dayanır. Öğrenme protokolü çalışmalarda gün ve deneme sayısı olarak farklılık gösterse de deneme sayısının arttıkça hayvanın platformu bulma süresinin (escape latency) azalması gerekir. Belleğin değerlendirilmesi için ise platform kaldırıldığında hayvanın platformu arama davranışından yararlanır.

Testin uygulanması: Tankın içine 24°C'lik su doldurulmuştur. Bir kadrana yerleştirilen platform su seviyesinin 2 cm altında tutulmuştur. 4 gün boyunca her gün iki oturum şeklinde uygulanan testte sıçanlar belirli 4 noktadan 4 kez suya bırakılmış

ve 90 saniye boyunca platformu bulmaları için yüzmelerine izin verilmiştir. Bulamadıkları takdirde sıçanlar platform üzerine yerleştirilerek 30 sn. süreyle tutulmuş ve çevresel ipuçlarını görmelerine fırsat verilmiştir. Her oturum için platformu bulma süresi kaydedilmiş ve günlük ortalamaları alınmıştır. Belleği test etmek için (probe fazı) 5. gün platform kaldırılarak sıçanlar platformun bulunduğu kadranın tam karşısından suya bırakılarak bir kez 90 saniye yüzdürülmüş ve platformun bulunduğu kadranda bulunma süresi ve platformu çaprazlama sayısı kaydedilmiştir.

3.2.5 Yükseltilmiş artı labirent testi

Sıçan ve farelerde anksiyetenin değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılır. Yerden 50 cm yükseklikte, uzunlukları 50 cm ve genişlikleri 10 cm' lik açık ve kapalı kollar içeren, artı şeklinde bir labirenttir. Otizmde anksiyete ana semptomlar arasında yer alması da hastalığa sıklıkla eşlik etmektedir. VPA modelinde artmış anksiyete belirgin olarak gözlenmektedir (199, 206, 223).

Testin uygulanması: Sıçan yüzü açık kollardan birine bakacak şekilde labirentin merkezine konularak ve 5 dakika boyunca kaydedilmiştir. Sıçanın herhangi bir kola girmiş sayılabilmesi için dört ekstremitelerinin de o kolda olması gereklidir. Açık kollarda geçen süre ve kapalı kollarda geçen süre parametreleri değerlendirilmiştir. Kapalı kollarda kalma süresinin artması anksiyete artışının göstergesidir.

3.2.6 Deneyin sonlandırılması

Deneylerin sonunda tüm sıçanlara ötanazi uygulanarak doku örnekleri toplanmıştır.

- P21 grubundaki yavrular izofluran anestezi altında dekapite edilmiştir.
- P50 grubundaki yavrular ise bilişsel/davranışsal testleri takiben izofluran anestezi altında dekapite edilmiştir.

P21 ve P50 gruplarında dekapitasyon öncesi jugular venden ya da kalpten kan alınmıştır, dekapitasyon sonrası beyinleri çıkartılarak şok dondurma uygulanmıştır. Şok dondurma öncesinde prefrontal korteks bütün beyinden ayrılmıştır.

Beyin, santal sulkustan itibaren bistüri ucu yardımıyla dorsomedial, ventromedial, ventrolateral ve orbitofrontal prefrontal korteksi içerecek şekilde izole edilmiştir.

3.3 Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi

P21 ve P50 gruplarının prefrontal korteksinde, mitokondriyal füzyon, fizyon, mitofaji belirteçleri analiz edilerek mitokondri dinamiklerinin otizmin gelişimsel süreçteki değişimi ve etkisi belirlenmiştir.

3.3.1 RNA izolasyonu ve gen ifadesi analizleri

3.3.1.1 RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA beyin dokularından Qiagen RNeasy mini kit (#74106) kullanılarak üreticinin belirttiği protokol uygulanarak izole edildi. RNA kalitesi, saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, #ND-2000) ile belirlenmiştir.

Eşit miktarda RNA kullanılarak cDNA sentezi, SensiFAST cDNA sentez kiti (Bioline, Bio-65053) ile üreticinin belirttiği protokol kullanılarak sentezlenmiştir.

3.3.1.2 Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile gen ifadesinin belirlenmesi

VDAC1, COX IV, Bnip3, PARKIN, PINK1, P62, LC3B ve OPA genlerinin ifadeleri postnatal 21. ve 50. günde GM SYBR qPCR Kit (w/o ROX) (Genemark Bio, #QPSY02-1) kullanılarak incelenmiştir. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. qRT-PCR’da kullanılan termal döngü Tablo 1’de, deneylerde kullanılan primerlerin dizileri ise Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. qRT-PCR döngüsü.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
UDG aktivasyonu	95	120	1

Dual-Lock DNA Polymerase	95	120	1
Denaturasyon	95	15	
Tavlama	55	15	40
Uzama	72	60	

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Primer	Sekans (5'-3')	Referans
VDAC1_F	TGATGGGACGGAGTTTGG	(224)
VDAC1_R	ACCCGCATTGACGTTCTT	
COX IV_F	ACGAGAGCTTCGCTGAGATGAACA	(225)
COX IV_R	AGCTCTTCTCCCAGATCAGCACAA	
Bnip3_F	AGCATGAATCTGGACGAAGC	(226)
Bnip3_R	AACATTTTCTGGCCGACTTG	
PARKIN_F	CTGGCAGTCATTCTGGACAC	(227)
PARKIN_R	CTCTCCACTCATCCGGTTTG	
PINK1_F	CATGGCTTTGGATGGAGAGT	(227)
PINK1_R	TGGGAGTTTGCTCTTCAAGG	
P62_F	TCCCTGTCAAGCAGTATCC	(228)
P62_R	TCCTCCTTGGCTTTGTCTC	
LC3B_F	GACTTCCGGAAAGCTCTGCT	(228)

LC3B_R	ACCAGCATCGTAGAGGGTCT	
OPA_F	ATCATCTGCCACGGGTTGTT	(227)
OPA_R	GAGAGCGCGTCATCATCTCA	
GAPDH_F	AATGCATCCTGCACCACCAA	(228)
GAPDH_R	GATGGCATGGACTGTGGTCA	

3.3.2 Mitokondriyal dinamiklerin akış sitometrisi ile ölçümü

P21 ve P50 gruplarındaki sıçanların PBMC hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli, kütlesi ve süperoksit üretimin ölçümü de gerçekleştirilmiştir. Beyin dokusu yanısıra PMBC hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerin ölçülmesi otizmin etkilediği beyin dokusunun yanısıra periferik sisteme etkisinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu hücrelerde mitokondri kütlesi, mitokondriyal membran potansiyeli, kütlesi ve ROS miktarı MitoTracker Green FM, MitoTracker Red CMXRos ve MitoSox (Thermo Fisher) floresan boyaları ile ürün sağlayıcının protokolüne uygun olarak ölçülmüştür. İlk olarak bu boyaların konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra bu belirlenen konsantrasyonlar ile PBMC'ler 15-20 dk inkübe edilerek ve flow sitometri (BD FACS verse) ile ölçüm yapılmıştır.

3.4 İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism (version 8.0.0, GraphPad Software, ABD) programı kullanılmıştır. qRT-PCR verileri ortalama \pm standart sapma, diğer tüm veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk normalite testi ile incelenmiştir. Normal dağılıma uyan veriler parametrik testler (ikili grup karşılaştırmaları Student'ın t-testi, çoklu grup karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizini takiben Tukey'in çoklu karşılaştırma testi) ile, uymayan veriler parametrik olmayan testler (ikili grup karşılaştırmaları Mann-Whitney U, çoklu grup karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testini takiben Dunn'ın çoklu

karşılaştırma testi) ile incelenmiştir. Morris su tankı öğrenme denemelerinin karşılaştırılmasında tekrarlı varyans analizleri karşılaştırması ve tek yönlü varyans analizini takiben Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

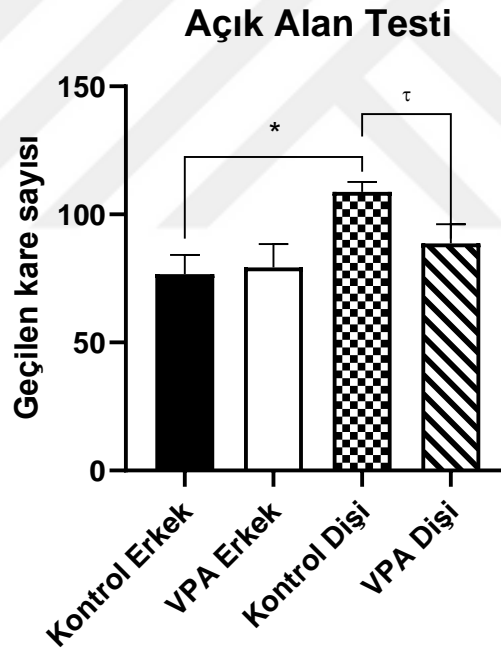


4 BULGULAR

4.1 Bilişsel/Davranışsal Testler

4.1.1 Açık alan testi

Açık alan testinde, erkek sıçanlarda geçilen kare sayısı; kontrol ve VPA grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$; Şekil 5). Dişi sıçanlar karşılaştırıldığında ise kontrol grubu sıçanlara kıyasla VPA grubundaki sıçanlar anlamlı derecede daha az kareden geçiş yapmıştır ($p<0,05$; Şekil 5). Kontrol grubu dişi sıçanlar kontrol grubu erkek sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla kareden geçmiştir ($p<0,05$; Şekil 5). Ancak VPA grubu erkek ve dişi sıçanlar arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 5).



Şekil 5. Açık alan testi sonuçları (* $p<0,05$ Kontrol dişi grubuna göre, τ $p<0,05$ VPA dişi grubuna göre)

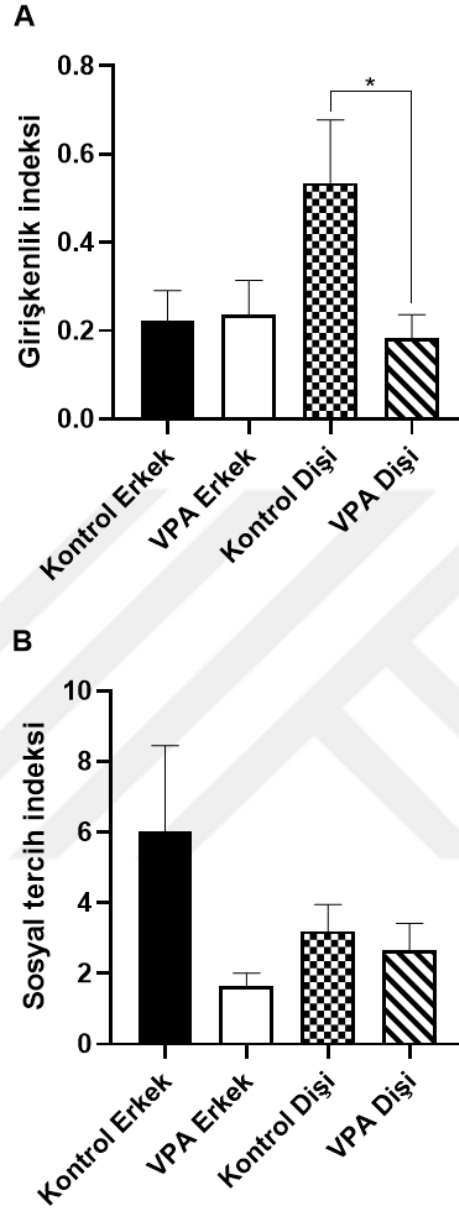
4.1.2 Üç odalı sosyal etkileşim testi

Üç Odalı Sosyal Etkileşim Testi Girişkenlik İndeks sonuçlarına göre, Kontrol Erkek grubu ile VPA Erkek grubu verileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak

anlamli bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 6A) Kontrol Dişu grubu değerlerine göre ise VPA Dişu grubu değerleri istatistiksel olarak anlamli oranda düşük bulunmuştur ($p<0,05$; Şekil 6A). Kontrol Erkek grubu değerlerine göre Kontrol Dişu grubu değerleri karşılaştırıldığında VPA Erkek grubu değerleri ile VPA Dişu grubu verileri arasında anlamli bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 6A).

 Odalı Sosyal Etkileşim Testi Sosyal Tercih İndeks sonuçlarına göre ise, Kontrol Erkek grubu sıçanların değerlerine göre VPA Erkek grubu sıçanların değerleri daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamli bulunmamıştır ($p>0,05$; Şekil 6B). Kontrol Dişu grubu ve VPA Dişu grubu deneklerin verileri arasında; Kontrol Erkek grubu ve VPA Dişu grubu deneklerin verileri arasında ve VPA Erkek grubu verileri ile VPA Dişu grubu deneklerin verileri arasında anlamli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$; Şekil 6B).

Üç Odalı Sosyal Etkileşim Testi

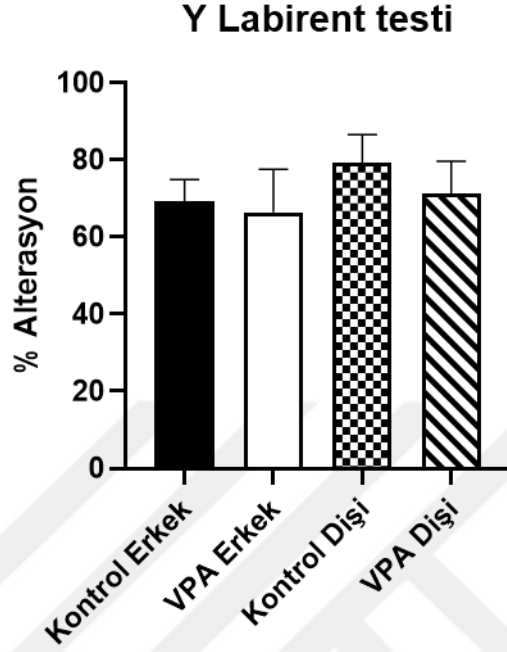


Şekil 6. Üç Odalı Sosyal Etkileşim testi (A) Girişkenlik indeksi ve (B) Sosyal Tercih indeksi sonuçları (* $p < 0.05$ Kontrol dişi grubuna göre).

4.1.3 Y labirent testi

Y labirent testi sonuçlarına göre % alterasyon oranları karşılaştırıldığında; Kontrol Erkek grubu deneklerin değerleri ile VPA Erkek grubu sıçanların değerleri arasında; Kontrol Dişi grubu deneklerin değerleri ile VPA Dişi grubu deneklerin verileri arasında; Kontrol Erkek grubu deneklerin değerleri ile VPA Dişi grubu deneklerin

verileri arasında ve VPA Erkek grubu verileri ile VPA Dişi grubu deneklerin verileri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$; Şekil 7).



Şekil 7. Y labirenti testi alterasyon (%) sonuçları.

4.1.4 Morris su labirenti testi

Öğrenme fazının uygulandığı 4 günlük süre boyunca tüm gruplardaki hayvanlar birinci güne göre platformu giderek daha kısa süre bulmuşlardır ($p<0,05$; Şekil 8A).

Gruplar arasında platformun yerini öğrenmeleri açısından;

Birinci gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$; Şekil 8B).

İkinci eğitim günleri karşılaştırıldığında; hem erkek hem de dişi VPA Grubu sıçanlar platformu Kontrol Grubu deneklere göre daha geç bulmuşlardır (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,0001$; Şekil 8B). Kontrol erkek grubu ile Kontrol Dişi grubu platformu bulma süreleri açısından farklı bulunmamışlardır ($p>0,05$; Şekil 8B). VPA Dişi grubu sıçanlar platformu VPA Erkek grubu sıçanlara göre daha geç bulmuştur ($p<0,001$; Şekil 8B).

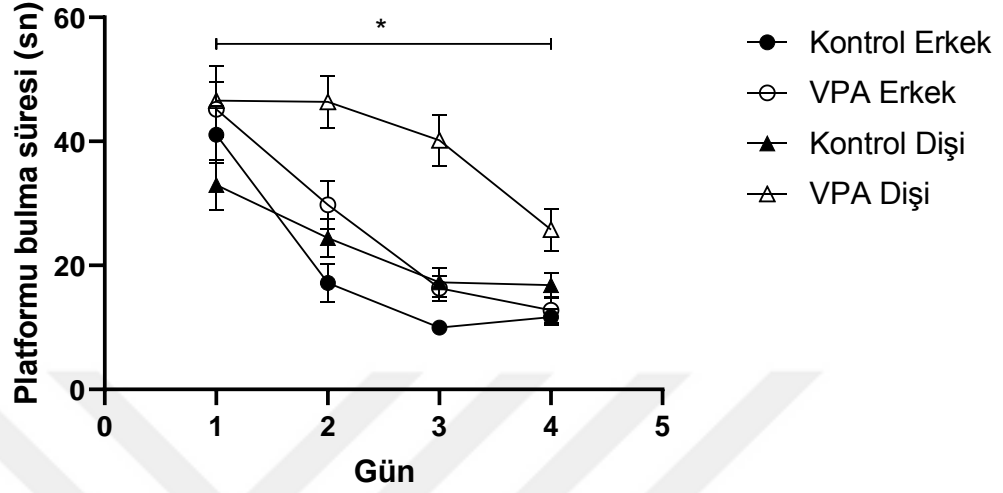
Üçüncü gün değerleri karşılaştırıldığında; Kontrol Erkek grubu ile VPA Erkek grubu verileri arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 8B). VPA Dişi grubu sıçanlar platformu hem Kontrol Dişi grubu hem de VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla daha geç sürede bulmuştur ($p<0,0001$; Şekil 8B).

Dördüncü gün değerleri karşılaştırıldığında; Kontrol Erkek grubu ile VPA Erkek grubu, Kontrol Dişi grubu ile VPA Dişi grubu ve Kontrol Erkek grubu ile Kontrol Dişi grupları platformu bulma süreleri arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 8B). VPA Dişi grubu sıçanlar VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla platformu daha geç bulmuşlardır ($p<0,0001$; Şekil 8B).

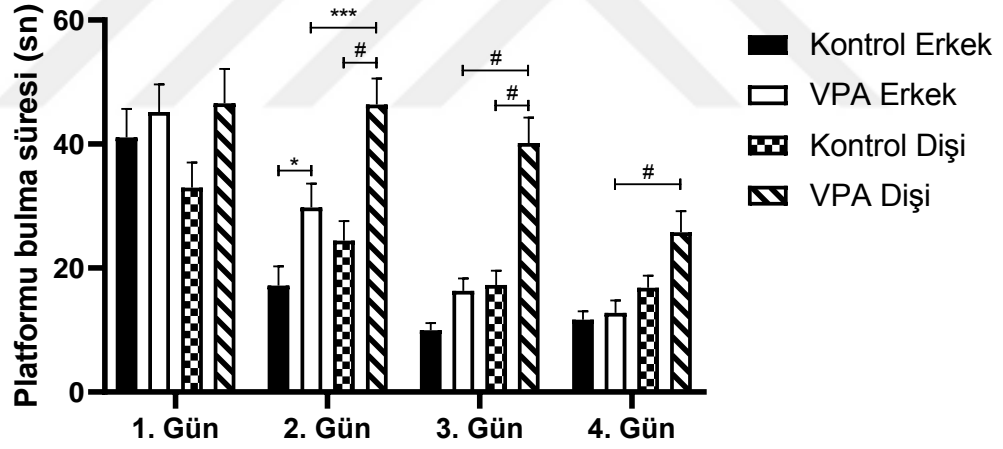


Morris Su Labirenti Testi Eğitim Fazı

A



B

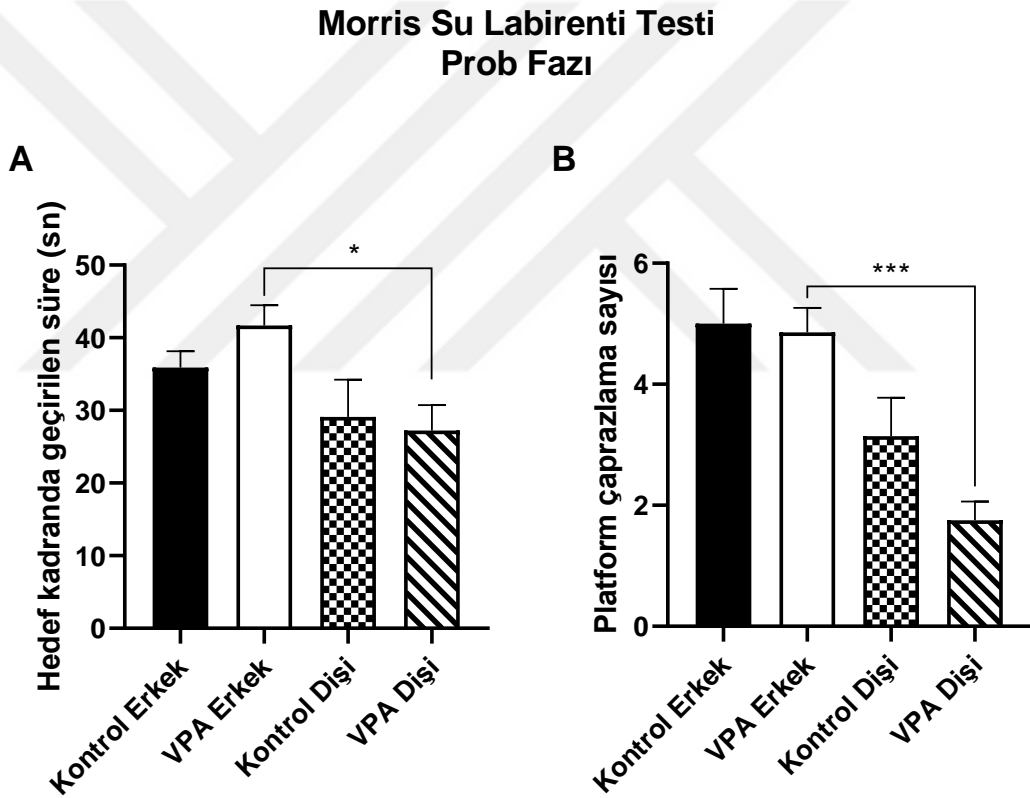


Şekil 8. (A-B) Morris su labirenti eğitim fazı boyunca platformu bulma süreleri (* $p < 0,05$ VPA erkek grubuna göre, *** $p < 0,001$ VPA Diği grubuna göre, # $p < 0,001$ VPA Diği grubuna göre).

Prob fazında; Kontrol Erkek grubu ile VPA Erkek grubu, Kontrol Diği grubu ile VPA Diği grubu ve Kontrol Erkek grubu ile Kontrol Diği grubu deneklerin Platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreleri arasında fark saptanmamıştır ($p > 0,05$; Şekil

9A). VPA Dişi grubu sıçanların VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreleri daha kısa bulunmuştur ($p<0,05$; Şekil 9A).

Prob fazında; Kontrol Erkek grubu ile VPA Erkek grubu, Kontrol Dişi grubu ile VPA Dişi grubu ve Kontrol Erkek grubu ile Kontrol Dişi grubu Platformu çaprazlama sayıları karşılaştırıldığında aralarında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 9B). VPA Dişi grubu sıçanların VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla platformu çaprazlama sayıları anlamlı oranda daha az bulunmuştur ($p<0,001$; Şekil 9B). Bunun yanında platformu çaprazlama sayısı, dişi hayvanlarda neredeyse anlamlı şekilde azaldı (Student'in t-testi, $p=0,06$; Şekil 9B).



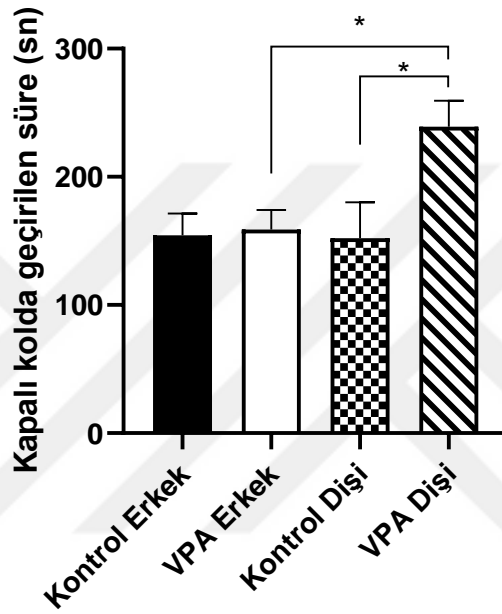
Şekil 9. Morris su labirenti prob fazında (A) hedef kadranda geçirilen süre ve (B) platform çaprazlama sayısı (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$ VPA Dişi grubuna göre).

4.1.5 Yükseltilmiş artı labirent testi

Yükseltilmiş artı labirent testi kapalı kolda geçirilen süre değerleri karşılaştırıldığında; Kontrol Erkek grubu sıçanlar ile VPA Erkek grubu sıçanlar

arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 10). Kontrol Dişi grubu sıçanlara göre VPA Dişi grubu sıçanlar daha uzun süre kapalı kolda kalmışlardır ($p<0,05$; Şekil 10). Kontrol Erkek grubu sıçanlar ile Kontrol Dişi grubu sıçanların süreleri arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$; Şekil 10). VPA Erkek grubu sıçanlara göre VPA Dişi grubu sıçanlar daha uzun süre kapalı kolda kalmışlardır ($p<0,05$; Şekil 10).

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi



Şekil 10. Yükseltilmiş artı labirent testi kapalı kolda geçirdikleri süre ($*p<0,05$ VPA Dişi grubuna göre).

4.2 Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi

4.2.1 Gen ifadesi analizleri

VDAC1, *COX IV*, *Bnip3*, *PARKIN*, *PINK1*, *P62*, *LC3B* ve *OPA1* genlerinin ifadeleri hem postnatal 21. günde (puberte öncesi) hem de postnatal 50. günde incelenmiştir. Postnatal 21. gün gen ifadelerinde kontrol ve VPA grupları cinsiyet gözetmeksizin karşılaştırılmıştır.

Relatif *VDAC1* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde dişi VPA grubu hayvanlarda relatif *VDAC1* ifadesi azalma

göstermiş olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0,05$; Şekil 11 A), VPA Erkek grubu hayvanlarda relatif *VDAC1* ifadesi Kontrol Erkek grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,001$; Şekil 11A).

Relatif *COX IV* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde relatif *COX IV*, VPA Dişi grubu, Kontrol Dişi grubuna göre ve VPA Erkek grubu da Kontrol Erkek grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,05$; Şekil 11B).

Relatif *Bnip3* ifadesi ne postnatal 21. günde ne de postnatal 50. günde gruplar arası fark göstermemiştir ($p>0,05$; Şekil 11C).

Relatif *PARKIN* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde VPA Dişi ve Erkek grubu hayvanlarda relatif *PARKIN* ifadesi eşlenik kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,01$; Şekil 11D).

Relatif *PINK1* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde VPA Erkek grubu hayvanlarda relatif *PINK1* ifadesi Kontrol Erkek grubuna kıyasla azalma göstermiş olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0,05$; Şekil 11E), VPA Dişi grubu hayvanlarda relatif *PINK1* ifadesi Kontrol Dişi grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,01$; Şekil 11E).

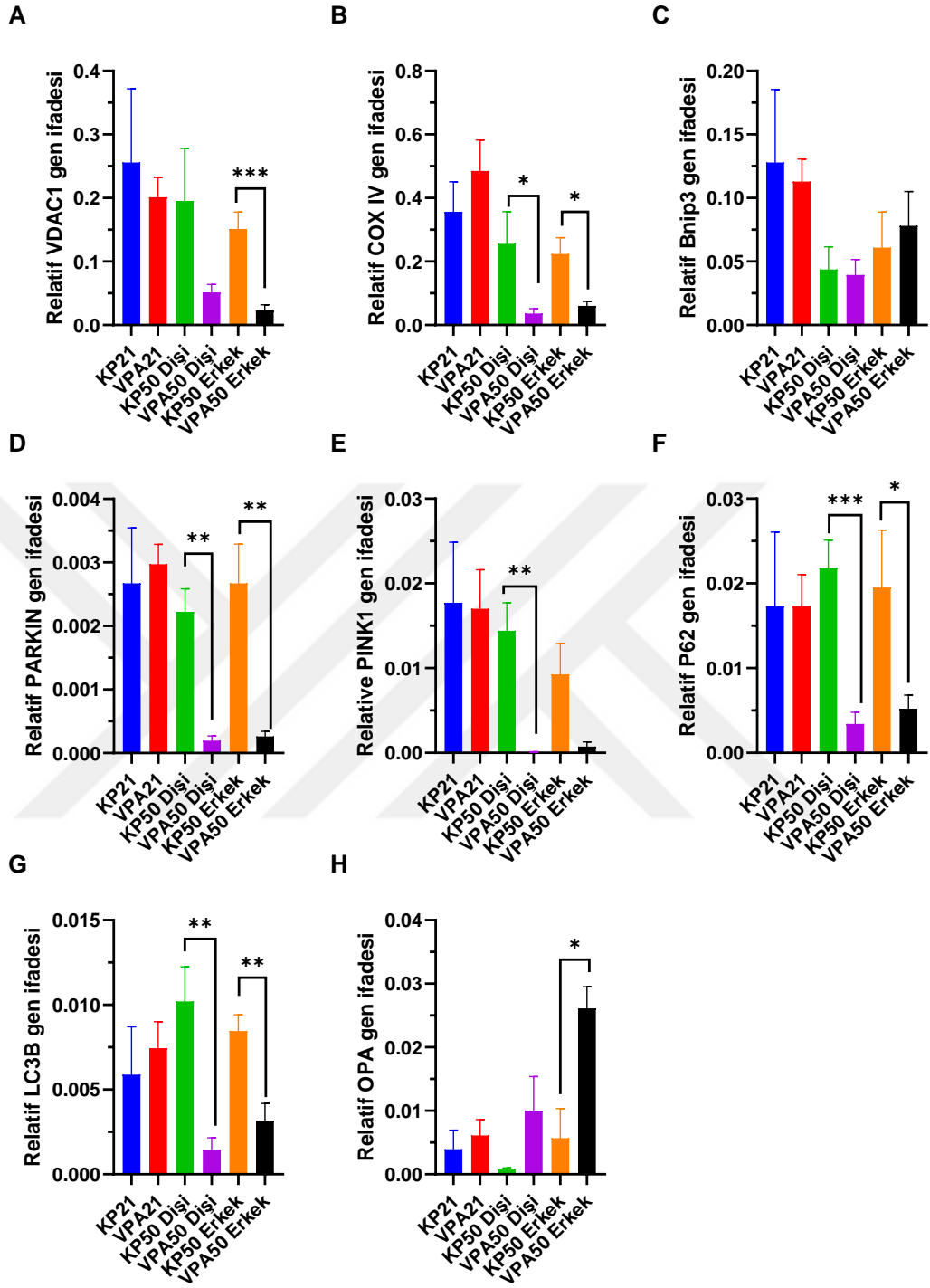
Relatif *P62* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde VPA Dişi ve Erkek grubu hayvanlarda relatif *P62* ifadesi eşlenik kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,05$; Şekil 11F).

Relatif *LC3B* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde VPA Dişi ve VPA Erkek grubu hayvanlarda relatif *LC3B* ifadesi eşlenik kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,01$; Şekil 11G).

Relatif *OPA* ifadesi postnatal 21. günde gruplar arası fark göstermemiştir. Postnatal 50. günde VPA Dişi grubu hayvanlarda relatif *OPA* ifadesi Kontrol Dişi artış

göstermiş olsa da bu yükselme istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0,05$; Şekil 11H), VPA Erkek grubu hayvanlarda relatif *OPA* ifadesi Kontrol Erkek grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$; Şekil 11H).

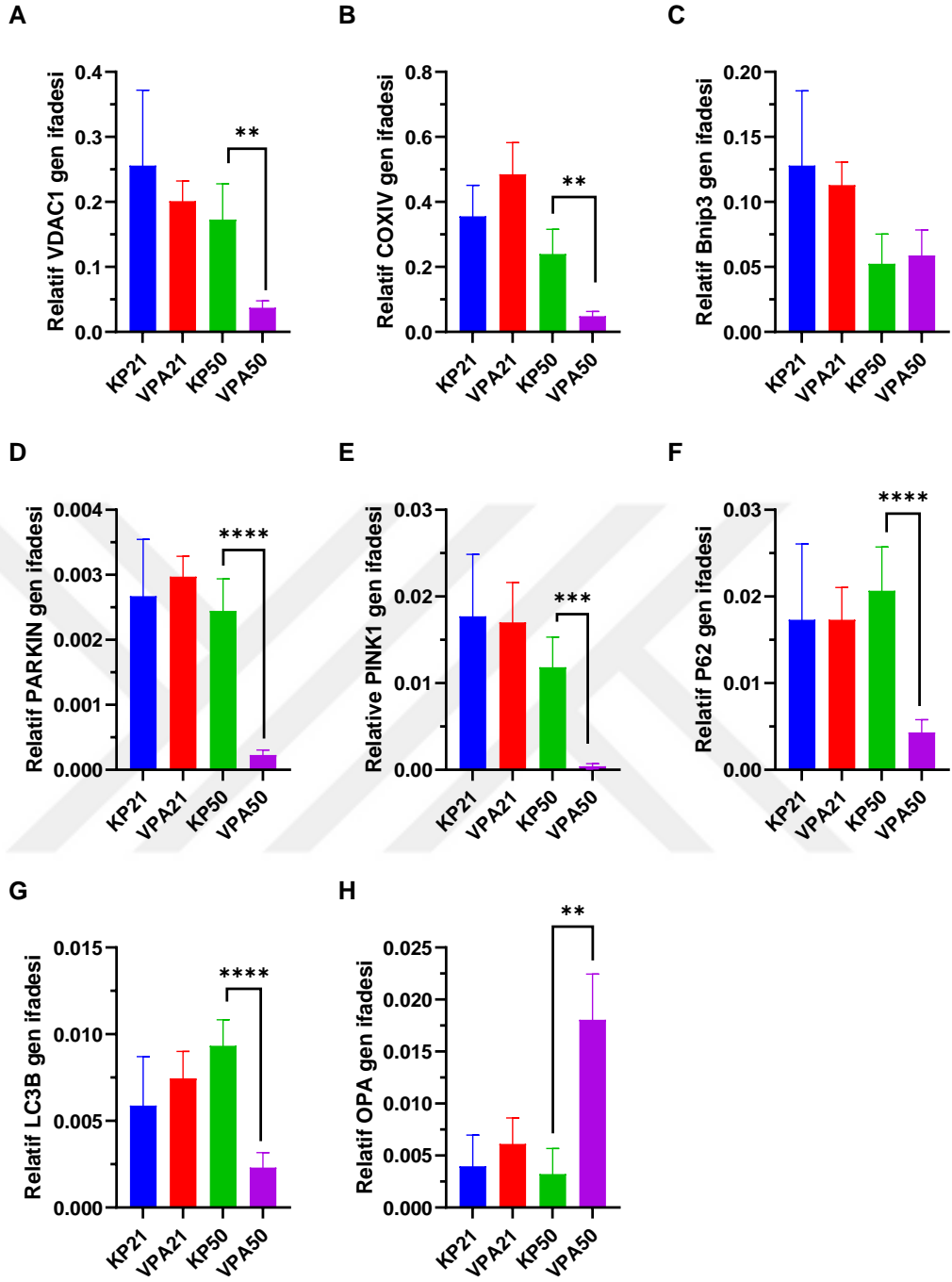




Şekil 11. Postnatal 21 (cinsiyet gözetmeksizin) ve 50. günde (cinsiyete göre) kontrol ve VPA grubu hayvanlarda (A) *VDAC1*, (B) *COX IV*, (C) *Bnip3*, (D) *PARKIN*, (E) *PINK1*, (F) *P62*, (G) *LC3B* ve (H) *OPA* genlerinin relatif ifadeleri (*p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001).

Postnatal 50. gün gen ifadelerinde kontrol ve VPA grupları aynı zamanda cinsiyet gözetmeksizin de karşılaştırılmıştır. Postnatal 50. günde VPA grubunda relatif *VDAC1*, *COX IV*, *COX IV*, *PARKIN*, *PINK1*, *P62* ve *LC3B* genlerinin ifadeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunurken ($p<0,01$; sırasıyla Şekil 12A, B, D, E, F ve G) relatif *OPA* ifadesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$; Şekil 12H). Relatif *Bnip3* ifadesi ise değişmemiştir ($p<0,01$; Şekil 12C).





Şekil 12. Postnatal 21 ve 50. günde (cinsiyet gözetmeksizin) kontrol ve VPA grubu hayvanlarda (A) *VDAC1*, (B) *COX IV*, (C) *Bnip3*, (D) *PARKIN*, (E) *PINK1*, (F) *P62*, (G) *LC3B* ve (H) *OPA* genlerinin relatif ifadeleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

4.2.2 Mitokondriyal dinamiklerin akış sitometrisi ile ölçümü

VPA'nın lenfosit ve monositlerde mitokondriyal dinamikler üzerine etkilerini incelemek amacıyla postnatal 21 ve 50. günlerde, hücreler kandan izole edildi ve MitoGreen, MitoRed ve MitoSOX ile boyanarak akış sitometri yöntemiyle incelendi.

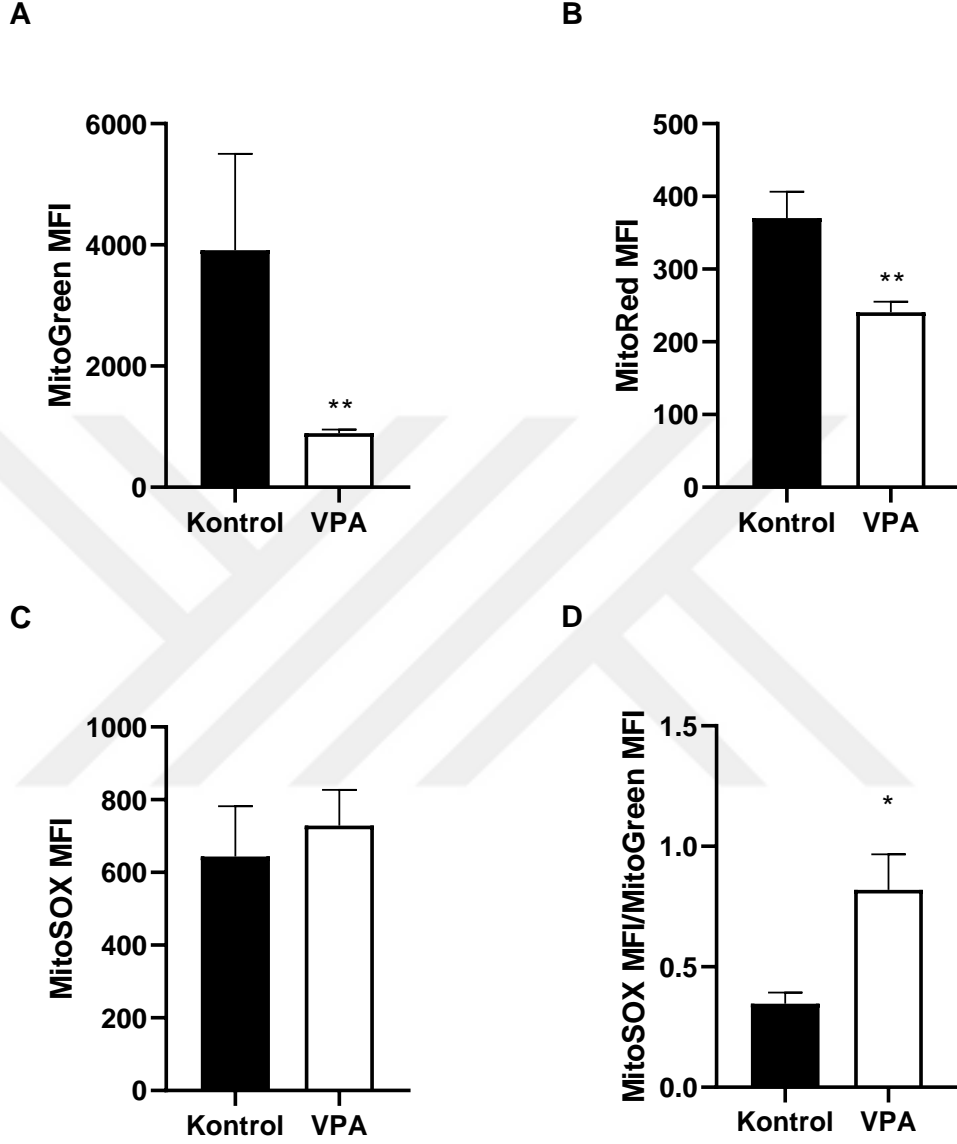
VPA grubunda postnatal 21. günde lenfosit MitoGreen ve MitoRed floresan yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,01$; Şekil 13A ve B). Lenfosit MitoSOX floresan yoğunluğu kontrol ve VPA gruplarında benzer bulunmuştur ($p > 0,05$; Şekil 13C). Bunun yanında, lenfosit MitoSOX/MitoGreen oranı VPA kontrol grubuna kıyasla grubunda anlamlı şekilde yüksek gözlemlenmiştir ($p < 0,05$; Şekil 13D).

Postnatal 50. günde MitoGreen lenfosit floresan yoğunluğu VPA Erkek grubu sıçanlarda Kontrol Erkek grubuna ve VPA Dişi grubu sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,0001$; Şekil 14A). VPA Dişi grubu sıçanlarda lenfosit MitoGreen kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0,05$; Şekil 14A). Lenfosit MitoRed floresan yoğunluğu Kontrol Erkek grubu sıçanlarda, VPA Erkek grubu sıçanlara ve Kontrol Dişi grubu sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p < 0,001$; Şekil 14B).

Bunun yanında VPA Dişi grubu hayvanlarda lenfosit MitoRed floresan yoğunluğu Kontrol Dişi grubu sıçanlara ve VPA Erkek grubu erkek sıçanlara kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,0001$; Şekil 14B). Lenfosit MitoSOX floresan yoğunluğu gruplar arasında bir farklılık göstermezken VPA Dişi grubu sıçanlarda ve VPA Erkek grubu erkek sıçanlarda benzer bulunmuştur ($p = 0,056$; Şekil 14C).

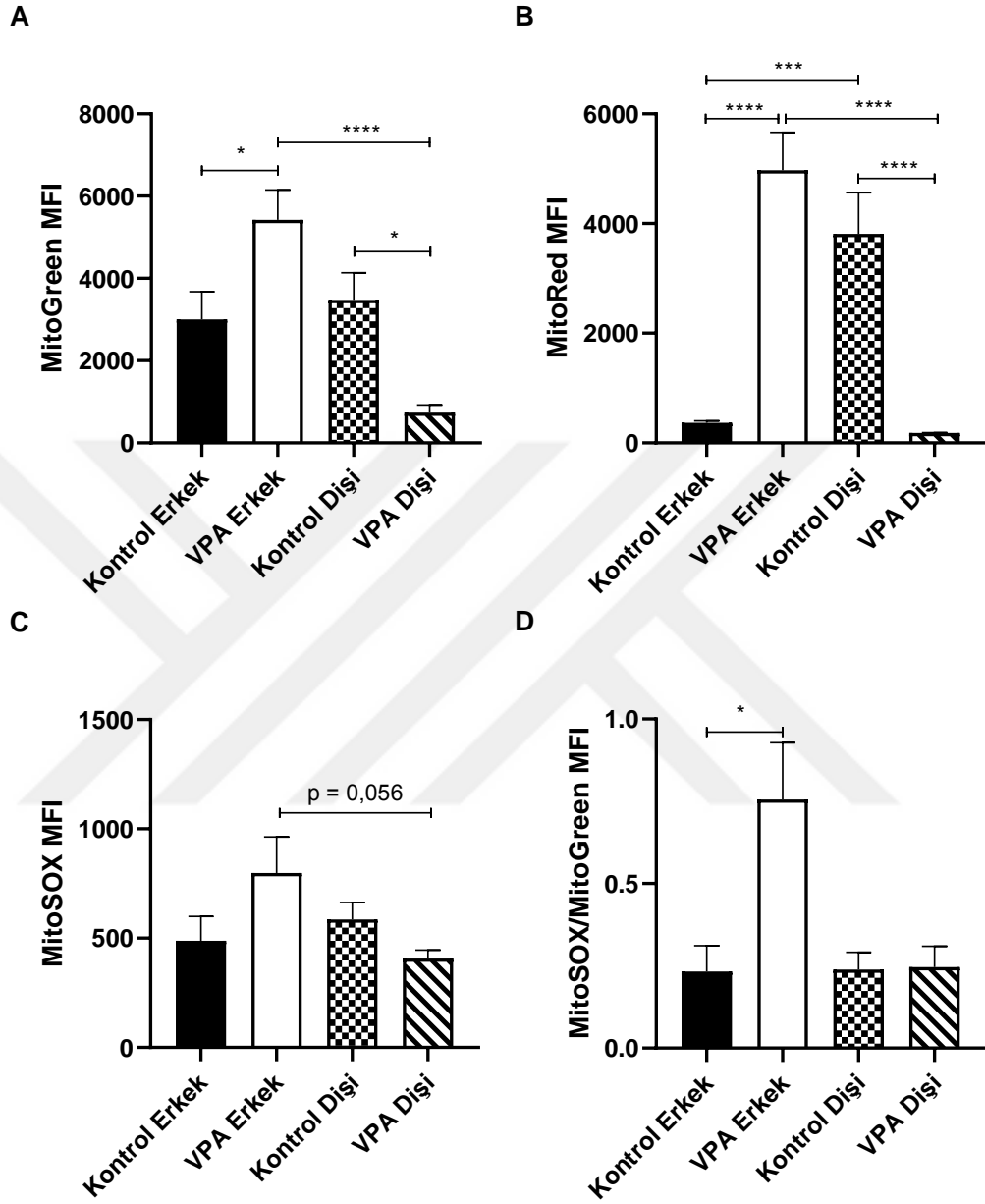
Lenfosit MitoSOX/MitoGreen oranı VPA Erkek grubu sıçanlarda Kontrol Erkek grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$; Şekil 14D). Bu oran VPA Dişi grubu sıçanlarda ise hem Kontrol Dişi grubu sıçanlara hem de VPA Erkek erkek sıçanlara benzer bulundu ($p > 0,05$; Şekil 14D).

Postnatal gün 21
Lenfosit



Şekil 13. Postnatal 21. gün kontrol ve VPA grubu sıçanlarda lenfosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoSOX/MitoGreen oranı (*p<0,05 ve **p<0,01).

Postnatal gün 50 Lenfosit



Şekil 14. Postnatal 50. gün kontrol ve VPA Erkek grubu ve dişi sıçanlarda lenfosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoSOX/MitoGreen oranı (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

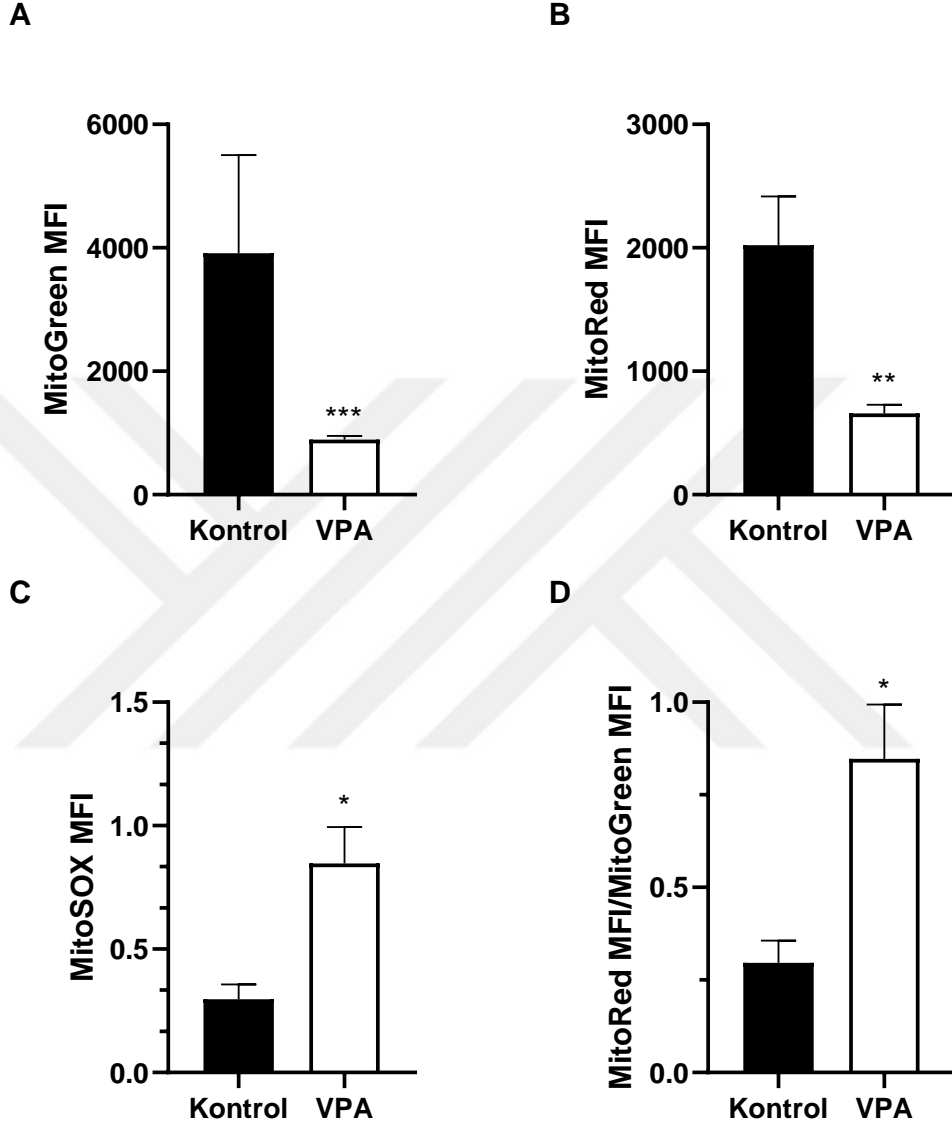
VPA grubunda postnatal 21. günde monosit MitoGreen ve MitoRed floresan yoğunluğunda anlamlı azalma gözlemlenirken (MitoGreen ve MitoRed için sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,01$; Şekil 15A ve B), monosit MitoSOX floresan yoğunluğu VPA grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$; Şekil 15C). Monosit MitoSOX/MitoGreen oranında VPA grubunda anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$; Şekil 15D).

Postnatal 50. günde monosit MitoGreen floresan yoğunluğu VPA Dişi grubu sıçanlarda Kontrol Dişi grubuna ve VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0,01$; Şekil 16A). Kontrol ve VPA Erkek grubu sıçanlar arasında ise bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$; Şekil 16A).

Benzer şekilde monosit MitoRed floresan yoğunluğu VPA Dişi grubu sıçanlarda Kontrol Dişi grubuna ve VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunurken (sırasıyla $p < 0,0001$ ve $p < 0,001$; Şekil 16B), Kontrol ve VPA Erkek grubu değerleri arasında bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$; Şekil 16B).

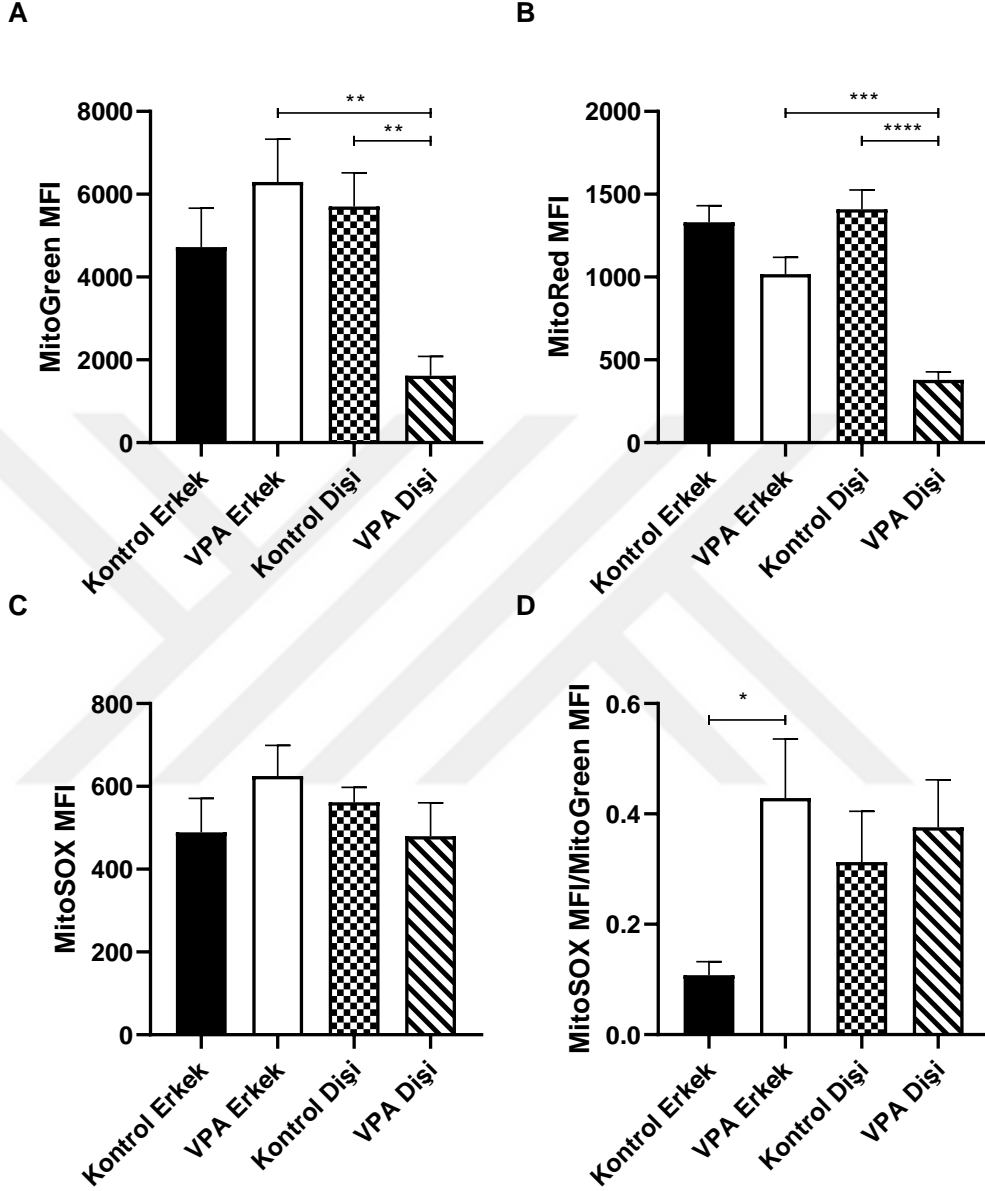
MitoSOX floresan yoğunluğu gruplar arasında bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$; Şekil 16C). MitoSOX/MitoGreen oranı VPA Erkek grubu sıçanlarda Kontrol Erkek grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunurken ($p < 0,05$; Şekil 16D), VPA dişi ve Kontrol Dişi grupları arasında benzer bulunmuştur ($p > 0,05$; Şekil 16D).

Postnatal gün 21 Monosit



Şekil 15. Postnatal 21. gün kontrol ve VPA grubu sıçanlarda monosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (* $p < 0,05$ ve $p < 0,01$).

Postnatal gün 50 Monosit



Şekil 16. Postnatal 50. gün kontrol ve VPA grubu erkek ve dişi sıçanlarda monosit (A) MitoGreen floresan yoğunluğu, (B) MitoRed floresan yoğunluğu, (C) MitoSOX floresan yoğunluğu ve (D) MitoRed/MitoGreen oranı (**p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).

5 TARTIŞMA

Birçok klinik çalışmada, gebelik sırasında VPA'ya maruz kalan çocuklarda gelişimsel bozukluklardan daha karışık otistik benzeri davranışlara kadar çok çeşitli anormalliklerin indüklenebileceği raporlanmıştır. Bu nedenle, günümüzde prenatal VPA maruziyeti, otizm patogenezinde yer alan çevresel bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (35, 229, 230). Klinik kanıtlar baz alınarak yapılan kemirgen çalışmalarında prenatal VPA maruziyeti ilaç kaynaklı bir prelinik otizm modeli olarak doğrulanmıştır (4, 231-234).

Bu çalışmamızda, prenatal VPA indüklü otizmin farklı cinsiyet ve yaşlardaki sıçanlarda bilişsel/davranışsal etkileri ile mitokondriyal dinamiklere olan etkisini inceledik. VPA maruziyeti genel olarak dişi hayvanlarda davranış testleriyle belirlediğimiz otizm benzeri davranışları indüklerken, mitokondriyal dinamiklerde rol oynayan protein genlerinde puberte öncesi herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken, bu genlerin deregülasyonu puberte sonrasında cinsiyet bağımlı olarak gerçekleşti. Bunun dışında, cinsiyetten bağımsız olarak değerlendirildiğinde, VPA maruziyeti yalnızca puberte sonrası gen ifadelerinde anlamlı değişikliğe sebep oldu. Bunun yanında lenfosit ve monositlerde mitokondriyal kütle, membran potansiyeli ve oksidatif strese prepubertal ve postpubertal dönemde farklılıklar meydana geldi.

5.1 Bilişsel/Davranışsal Testler

Açık alan testi, yeni bir çevredeki aktiviteyi, keşfetmeyi ve anksiyete ile ilişkili davranışları ölçmek için oldukça yaygın kullanılan bir testtir (235). Açık alan testi kullanılan çalışmalarda genellikle erkek sıçanlar dişi sıçanlara kıyasla daha az aktif olarak bulunmuştur (236-238). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde dişi sıçanlar erkek sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde daha aktifti. VPA'ya maruziyet sonrası açık alan testine alınan kemirgen deneylerinde elde edilen sonuçlar farklılıklar göstermektedir. Bazı çalışmalar VPA'ya maruz kalan kemirgenlerin genel lokomotor aktivitelerinde düşüş bildirirken (199, 223) bazı çalışmalar artış bildirmiştir (239-241). Uyguladığımız açık alan testinde, VPA grubu erkek sıçanların geçtiği kare sayısında eşlenik kontrol grubuna kıyasla bir fark gözlemlenmezken, VPA dişi sıçanlarda geçilen kare sayısı azalmıştır. Yapılan bir çalışmada ise VPA'ya maruz kalan erkek

sıçanlardaki lokomotor aktivitenin dişilere kıyasla daha yüksek olduğu ancak VPA indüksiyonunun lokomotor aktiviteyi değiştirmedeği bulunmuştur (212). Başka bir çalışmada ise VPA'ya maruz kalan erkek sıçanlarda lokomotor aktivite değişmezken, dişi sıçanlarda lokomotor aktivitenin arttığı gözlenmiştir (240). Bu nedenle, VPA maruziyetinin yarattığı lokomotor aktivitedeki değişimler cinsiyetler arasındaki fizyolojik farka bağlanabilir.

Üç odalı sosyal etkileşim testi kemirgenlerde sosyal girişkenlik ve sosyal tercihi ölçmeye yarayan bir testtir (242). Bazı çalışmalarda VPA'ya maruz kalan erkek hayvanlarda sosyal tercih indeksi azalırken dişi hayvanlarda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. (243, 244), VPA'nın hem erkek hem de dişi sıçanlarda sosyal etkileşimi azalttığı çalışmalar da mevcuttur (245). Çalışmamızda girişkenlik indeksi erkek sıçanlar arasında farklılık göstermezken, dişi VPA grubu sıçanlarda anlamlı şekilde azalmıştır. Sosyal tercih indeksinde ise erkek sıçanlarda bir düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değilken, dişi hayvanlarda da benzer sonuç bulunmuştur. Sosyal davranışın kontrolünde yer alan beyin bölgeleri arasında kortikolimbik yapılar bulunmaktadır ve bunların işlevselliğindeki değişimler, OSB'nin karakteristik özelliklerinden olan sosyal iletişim bozukluklarına katkıda bulunan bir nöral ağları temsil edebilir (246-248). Özellikle, bu bölgeler dopaminerjik nöronlar tarafından modülasyona tabi tutulur ve mezokortikolimbik devrede dopaminerjik nörotransmisyonun işlev bozukluğunun OSB'de gözlenen sosyal eksikliklere yol açtığı öne sürülmüştür (249).

Otizm hayvan modellerinde tekrarlanan hareketlerin tespitinde sıklıkla kullanılan Y labirent testinde elde edilen spontan alternasyon sonuçları çeşitlidir. Bazı çalışmalar spontan alternasyonda azalma gösterirken (250, 251), bazı çalışmalarda ise herhangi bir fark gözlemlenmemiştir (252, 253). Bizim çalışmamızda da Y labirent testinde spontan alternasyon sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

VPA indüklü prenatal otizm modellerinde yapılan çalışmalarda kognitif disfonksiyon raporlayan çalışmalar bulunmaktayken (254, 255), hipokampal nöron yoğunluğu artması ile ilişkili artan uzaysal öğrenme ve bellek de raporlanmıştır (256). Çalışmamızda Morris su labirenti eğitim fazında 2. günde her iki cinsiyette de

platformu bulma süresi anlamlı şekilde daha uzun bulunurken, 3. ve 4. günlerde yalnızca VPA Dişi grubu sıçanların platformu bulma süresi anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bunun yanında prenatal VPA grubu dişilerin hedef kadranda geçirilen süre ve platformu çaprazlama sayısı VPA Erkek grubu sıçanlara kıyasla anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiş, benzer şekilde prenatal VPA muamelesi dişilerde platformu çaprazlama sayısı neredeyse anlamlı azalmaya neden olmuştur. Cinsiyet farkının uzaysal öğrenme ve belleğe olan etkisini araştıran bir çalışmada VPA'ya maruz kalan dişi sıçanların erkek sıçanlara kıyasla uzaysal öğrenmede daha iyi performans gösterdiğini bildirirken, referans bellekleri arasında herhangi bir fark raporlamamıştır (257). Daha önce yapılan bir çalışmada erkek sıçanların daha fazla uzun dönem potensiyalizasyon ve perforant yolak-dentat girus sinapsına sahip olduğunu belirtmiş ve bunun erkek sıçanların daha iyi uzaysal öğrenme ve bellek üzerindeki cinsiyet farkını açıklayabileceğini belirtmiştir (258).

Yükseltilmiş artı labirent, anksiyete ile ilgili davranışları test etmek için açık alan testi ile birlikte oldukça yaygın kullanılan bir testtir (253). Çalışmamızda VPA erkek sıçanlarda kapalı kolda geçirilen süre üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmazken, dişi sıçanlarda anksiyetik etki göstermiştir. Yapılan bir çalışmada VPA maruziyeti sıçanlarda anksiyetede azalma (açık kolda geçirilen sürede ve açık kola giriş sayısında artış) gözlemlenmiştir (253). Diğer bazı çalışmalar ise VPA indüklü otizm modelinde anksiyetede artış gözlemlenmiştir (241, 259, 260). Oksitosin hormonu, amigdala, hipokampus ve ventral tegmental alan dahil olmak üzere sosyal algı, biliş ve sosyal kaygıdan sorumlu belirli beyin alanlarında yoğun olarak dağılmış projeksiyonlar ve reseptörler ile sosyal davranış modüle etmede önemli roller oynar (261, 262). OSB'nin altında yatan mekanizmalar hala büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, oksitosin sistemlerindeki eksikliğin gelişiminde rol oynadığı öne sürülmüştür (263, 264). Amigdala, sosyal davranış ve anksiyeteyi düzenleyen beyin devresinin önemli bir parçasıdır (265). VPA indüklü otizm modelinde intraamigdaloid oksitosin uygulamasının anksiyeteyi azalttığı bildirilmiştir (266). Bununla birlikte otistik çocuklarda oksitosin seviyelerinin düşük olmaya meyilli olduğu bildirilmiştir (267). Oksitosin seviyelerinin kadınlarda erkeklerden daha yüksek olduğu bilinmektedir (268). Bu da dişi hayvanlarda oluşan otizm sebebi oksitosin azalması veya oksitosin

sisteminde meydana gelen bozulma ve beyin kimyasının değişmesi sonucu artan anksiyeteyi açıklayabilir.

5.2 Mitokondriyal Dinamiklerin İncelenmesi

Son yıllarda, giderek artan sayıda çalışma hem doğum öncesi dönemde hem de hayatın en erken evrelerinde OSB gelişiminde rol oynayan bir patofizyolojik mekanizma olarak, bağışıklık disfonksiyonu ve bozulmuş redoks homeostazi, yani OxInflammation fenomeni (269) arasında olası bir iletişimin katkısına dair kanıt sağlamıştır (31). Redoks ve bağışıklık sinyal yolları arasında bir merkez olarak mitokondri, OSB patofizyolojisinde merkezi bir rol oynuyor gibi görünmektedir (270). Son derece dinamik ve birbirine bağlı organeller olarak, mitokondriler, sürekli füzyon, fisyon ve biyogenez ve mitofaj gibi devir olaylarından geçerek şekillerini, boyutlarını ve sayılarını değiştirebilir (271).

VDAC1'in verimli biyoenerjetik düzenleme için dış mitokondriyal membran boyunca metabolitlerin, katyonların ve nükleotitlerin akışını düzenleyerek mitokondri ve sitozol arasındaki metabolik etkileşimi kontrol ettiği düşünülmektedir. Bu görüşle tutarlı olarak, insan VDAC1 eksikliğinin, bozulmuş piruvat oksidasyonu ve ATP üretimi gösterdiği bildirilmiştir (272). Daha sonraki çalışmalar VDAC1 eksikliğinin hem oksidatif hem de glikolitik çizgili kas biyopsilerinde ETZ komplekslerinde çoklu kusurlara neden olduğunu raporlamıştır (273, 274). Bunun yanında VDAC1 apoptozda ve oksidatif streste önemli roller üstlenmektedir (275). Sıçanlarda yapılan çalışmalar, VDAC'nin, kaudat çekirdek, hipokampus, hipotalamus ve beyincik dahil olmak üzere beynin bölgelerinde yoğun bir şekilde ifade edildiğini göstermektedir (276). Yapılan birkaç çalışmada ise otistik çocukların hem kaudat çekirdeğinde hem de serebellumunda anormallikler bildirmiştir (277-279). Kronik hafif stres modeli hayvanlarda yapılan bir çalışmada Vdac1 ifadesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma bulunmuştur (280). Bununla birlikte Vdac1 ifadesinde azalma olmuştur (281). Yaptığımız çalışmada, *VDAC1* ifadesi postnatal 21. günde bir değişiklik göstermemiş, postnatal 50. günde VPA Dişi grubu sıçanlarda anlamlı olmayan bir azalmaya sebep olurken, VPA Erkek grubu sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın yapılan analizlerdeyse VPA grubu sıçanlarda, *VDAC1* ifadesini anlamlı şekilde azalmış bulunmuştur.

COX IV, ETZ içinde bulunan beş proteinden biri olup OXPHOS ile ATP üretiminde rol almaktadır (282). Bir olgu sunumunda üç yaşındaki bir otizm hastasının kas biyopsisinde COX IV'ün referans aralığının altında olduğu bulunmuştur (283). COX IV, elektron taşıma zincirinin son reaksiyonunu, oksijenin suya indirgenmesini katalize eder ve ATP sentazın ATP sentezlemek için kullandığı elektriksel membran potansiyelinin oluşturulmasında kritik bir rol oynar (284). Çalışmamızda hem dişi hem de erkek VPA gruplarında *COX IV* ifadesi anlamlı olarak azalmıştır. Bu sonuçlar COX IV ifadesindeki azalmanın mitokondriyal membran potansiyelinde bozukluklara sebep olup mitokondriyal disfonksiyon oluşturabileceğini göstermektedir.

Bnip3, çeşitli hücrelerde yoğun olarak ifade edilir ve mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal otofaji (mitofaji) ve hücre apoptozu dahil olmak üzere çok sayıda hücrel sinyal yolağına katılarak birçok hücrel fonksiyonda yer alır (285-288). Spesifik disfonksiyonel mitokondriye yanıt olarak transkripsiyonel bir hedef olarak, Bnip3 öncelikle LC-3 ve ilgili moleküler reseptörleri ile etkileşim yoluyla mitokondriyal yıkım ve mitofajiyi düzenler (289, 290). OSB fare modelinde yapılan bir çalışmada, yabanıl tip farelere kıyasla prefrontal kortekste Bnip3 gen ifadesinde bir artış gözlemlenirken protein ifadesinde herhangi farklılık gözlemlenmemiştir (291). Bizim çalışmamızda ise *Bnip3* ifadesinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu farklılığın nedeni farklı otizm hayvan modelleri ve farklı kemirgen türleri olması olabilir.

Parkin ve PINK1, işlevsiz mitokondrinin seçici olarak ortadan kaldırılması için bir otofajik yol olan mitofajinin kilit düzenleyicileridir (292). PINK1 ve Parkin tarafından indüklenen mitofajiye, ubikuitin bağlama motiflerine ve LC3B bağlama motiflerine sahip adaptör proteinler aracılık eder (293). Bunun yanında mitofaji ve otofaji arasındaki seçim Parkin proteininin önemli bir substratı olan VDAC1'i ubikuitinleme paternine göre PINK1 bağımlı olarak gerçekleşir (293). PARK2 geninde ortaya çıkan mutasyonlar ile OSB arasında bir ilişki belirlenirken bu mutasyonların farklı olmasına rağmen otizm olduğu ancak semptomların değiştiği belirtilmiştir (294). Çin'de yapılan bir çalışmada ise otistik bireylerde belirli ekzonların delesyonu, dolayısıyla kopya sayısı varyasyonu sebebiyle azalan Parkin proteinini üreten *PARK2* geninde azalma, otizmle ilişkili bulunmuştur (295). Çalışmamızda P50'de *PARKIN*

ifadesi hem dişi hem de erkek VPA gruplarında anlamlı şekilde azalırken, *PINK1* ifadesi yalnızca dişi bireylerde anlamlı şekilde azalmış, erkek bireylerde de ciddi şekilde azalmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Cinsiyet gözetmeksizin yapılan analizlerde ise her cinsiyette de P50'de bu iki genin ifadesinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. VPA indüksiyonu sonucu azalan *PINK1* ve *PARKIN* ifadeleri mitofajide azalmaya sebep olarak hasarlı mitokondri birikimine sebep olup otizm patolojisine katkıda bulunabilir (296).

Adaptör bir protein olarak P62, tanıma ve seçici otofajide kritik bir rol oynamaktadır (297). P62, stres uyarılarına yanıt olarak ubikuitin ve otofajik bileşen olan LC3 ile etkileşim yoluyla ubikitinlenmiş proteinleri otofagozoma taşır (298). P62, *PARKIN* bağımlı mitofajide ubikitinlenmiş dış mitokondriyal membran proteinlerini tanıyarak bağlanırken *PARKIN* bağımsız mitofajide de rolü bulunmaktadır (299-301). Genetik otizm fare modeli kullanılan bir çalışmada ubikitinlenmiş agregasyonu ve bozulmuş otofaji gözlemlenmiştir (302). Benzer şekilde başka bir OSB benzeri fenotip gösteren bir genetik modelde p62 protein seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (303). Buna karşın, OSB hastalarının bir alt grubunda yapılan bir postmortem beyin çalışması p62 protein seviyelerinde artış göstermiştir (304). Bizim çalışmamızda P50. günde hem erkek hem de dişi VPA grubunda *p62* ifadesinde anlamlı şekilde azalma gözlemlendi. Bazı çalışmalar aşırı otofaji aktivasyonunun otizme neden olduğunu gösterirken, diğer çalışmalar otofaji eksikliğinin otizme neden olduğunu göstermiştir (305-309). OSB'li hastaların postmortem beyinlerinde yapılan bir çalışmada disregüle otofaji ve hiperaktif mTOR sinyali gözlemlendi (307). Aynı çalışma temporal kortekste otofagozom belirteci LC3-II'nin azaldığı ve otofaji substratı p62'nin arttığını göstermiştir (307). Mikroglia'da otofaji kaybının, sinaptik budanmayı bozduğu ve dendritik diken yoğunluğunun artmasına ve OSB'nin göstergesi olan anormal sosyal etkileşim ve tekrarlayan davranışlara neden olduğu bildirilmiştir (310). LC3, otofagozomların yanı sıra otofajik aktiviteyi izlemek için yaygın olarak kullanılan bir belirteçdir (311). Ayrıca, seçici otofaji sırasında, LC3'ün, kargo reseptörleri ile etkileşim yoluyla seçici kargoyu otofagozoma almak için bir adaptör protein olarak işlev gördüğünü gösterilmiştir (312). Çalışmamızda LC3B ifadesi P50'de hem dişi hem de erkek VPA grubunda anlamlı şekilde düşmüştür. Benzer şekilde VPA ile indüklenmiş otizm modeli hayvanlarda aktif LC3 miktarı anlamlı şekilde azalmış ve

mTOR inhibisyonu ile otofajik aktivitenin artmasının OSB benzeri fenotipte düzelmeye sebep olduğu bildirilmiştir (313). Bir diğer çalışmada da mTOR inhibisyonunun VPA indüklü otizm modellerinde mTOR hiperaktivitesi kaynaklı aktif LC3'te azalma bildirilmiştir (314). Bu sonuçlar bozulan mitofajik aktivitenin VPA indüklü otizm patofizyolojisinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir.

Metazoanlarda mitokondriyal membran füzyonu, sırasıyla dış ve iç zar füzyonunda görev alan büyük GTPaz'ların dinamin ailesinin üyeleri olan Mfn1/2 ve Opa1 tarafından katalize edilir (315, 316). Yapılan bir çalışmada, genetik fare otizm modelinde mitokondriyal füzyonda azalma ve fragmente mitokondride artış gözlenirken OPA1 protein seviyelerinde farklılık gözlenmemiştir (317). Bir başka çalışma otistik çocuklarda Mfn1 ve Mfn2 seviyelerinde anlamlı derecede artış, Opa1 seviyelerinde ise anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir (318). Mitokondriyal DNA polimeraz gama mutasyonları taşıyan hastaların fibroblastları üzerinde yapılan bir çalışmada VPA'nın mitokondriyal biyogenezi arttırdığı bulunmuştur (319). OSB'li çocukların yapılan oral mukoza örneklerinde ise *OPA1* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamsız bir artma gözlemlenmiştir (320). Bizim çalışmamızda ise *OPA1* seviyeleri VPA Dişi grubu ve erkek hayvanlarda artarken bu artış yalnızca VPA Erkek grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Cinsiyet gözetmeksizin yapılan analizlerde ise yine VPA grubunda *OPA1* seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulundu. Buna göre, *OPA1* ifadesindeki artışın nedeni, mitokondri hasarıyla birlikte homeostatik seviyelerde OXPHOS yapamayan ve mitofajiyle yok edilemeyen hasarlı mitokondrilerden dolayı üretilen ATP seviyesi azalırken, gereken ATP'yi sağlamak için bir tamir mekanizması olarak mitokondriyal kapasiteyi arttırmak amacıyla mitokondriyal füzyon gerçekleştirme çabası olabilir (321).

Oksidatif stres, pro-oksidan çevresel toksik maddelerden kaynaklanan (322-325) ve aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinden (54, 326) üretilen ROS, mitokondriyal disfonksiyon ile OSB arasında önemli bir bağlantı olabilir. Birbiriyle bağımlı vaka kontrollü çalışma, OSB'li çocukların plazma, bağışıklık hücrelerinde ve postmortem beyinlerinde, oksidatif stres ve hasarı belgelemiştir (327-330). Otistik çocukların periferik kan lenfositlerindeki mitokondriyal aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir (331). Bunun yanında anormal lenfosit aktivasyonu (332, 333) ve monosit

proinflamatuvar sitokin üretimi (334-336) de dahil olmak üzere çeşitli immün anormallikler OSB’de tekrarlanabilir şekilde rapor edilmiştir ve bunların OSB’nin ana ve OSB ile alakalı semptomlarının şiddetinin artması ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

MitoGreen, MitoRed ve MitoSOX sırasıyla mitokondriyal kütle (337), membran potansiyeli (338), mitokondriyal ROS (339) miktarının tespiti için kullanılan floresan boyalardır. MitoGreen tüm mitokondriyal kütlelerin belirlenmesi için kullanılan bir floresan belirteç olduğundan sağlıklı veya hasarlı mitokondri miktarını belirtmez ve özellikle eğer mitofajik yollarda bir problem varsa ve hasarlı mitokondri birikimi durumu söz konusuysa alınan sinyal yüksek olabilir (337). MitoRed mitokondriyal membran potansiyelini belirlemede kullanılır ve membran potansiyelindeki uzun süreli düşüş istenmeyen hücre ölümüne sebep olabilir (340), ancak aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelindeki orta şiddete bir depolarizasyon mitokondriyal ROS üretimini engelleyip antioksidan bir mekanizma olarak görev görebilir (341). Belirli seviyede ROS miktarı hücre fonksiyonu ve sağkalımı için gereklidir (342). MitoSOX ise mitokondriyal ROS üretimini göstermekte olup, artan mitokondriyal ROS miktarı çeşitli patolojilere sebep olmaktadır (343, 344). Çalışmamızda P21’de VPA grubunda hem lenfosit popülasyonunda hem de monosit popülasyonunda mitokondriyal kütle ve mitokondriyal membran potansiyelinde anlamlı olarak azalma bulunmuştur. Bu bulgumuz bize VPA’nın mitokondriyal periferel kandaki lenfosit ve monositlerde disfonksiyona sebep olduğunu göstermektedir. VPA ve kontrol grubundan elde edilen lenfositlerin mitokondriyal ROS miktarında herhangi bir fark bulunmamış olup, VPA grubu monositlerde P21’de mitokondriyal ROS miktarı anlamlı şekilde yüksekti. Monositlerin lenfositlerden daha yüksek miktarda oksidatif fosforilasyon yapması (345) VPA uygulaması sonucu monositlerdeki mitokondriyal ROS miktarının erken dönemde artmasının sebebi olabilir.

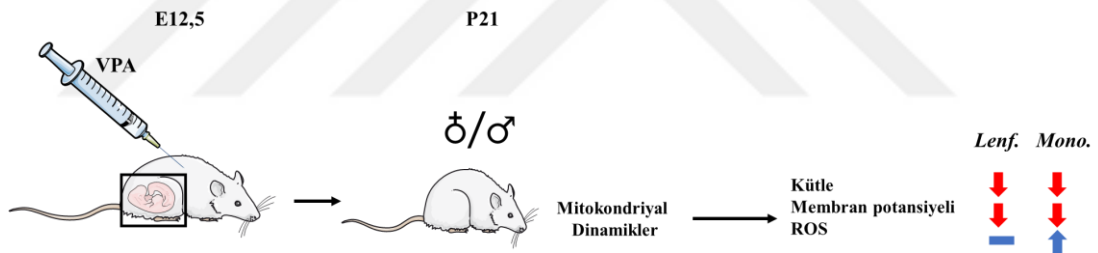
P50’de erkek VPA grubunda lenfositlerin mitokondriyal kütle ve mitokondriyal membran potansiyeli, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, mitokondriyal ROS miktarı değişmemiştir. Monositlerde ise P50’de erkek VPA grubunda lenfositlerin mitokondriyal kütle, mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal ROS miktarı farklı bulunmamıştır. P50’de dişi VPA grubunda

lenfositlerin mitokondriyal kütle ve mitokondriyal membran potansiyeli kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken, mitokondriyal ROS miktarı değişmemiştir. Yine P50 dışı VPA grubunda monositlerin mitokondriyal kütle, mitokondriyal membran potansiyeli anlamlı derecede düşük bulunmuş ve mitokondriyal ROS miktarı farklı bulunmamıştır. Otizmlili bireylerde PBMC'lerde metabolik aktivitenin bozulmuş olduğu yayınlar mevcuttur (346-348). P50'de mitokondriyal kütlede erkeklerde meydana gelen artış ve buna paralel olarak *OPA1* ifadesindeki artış mitokondriyal füzyondaki artışı düşündürmektedir. Mitokondriyal dinamiklerdeki bu cinsiyetler arası farklılıkların sebebi, cinsiyetler arası otizm sonucu oluşan inflamatuvar yanıtlardaki farklılıklar olabilir (347). Bunun yanında prenatal çevresel etkiler sonucu oluşan çok çeşitli mitokondriyal disfonksiyonlar da bu farklılıkların sebebi olabilir (348). OSB'li çocuklarda 3 ve 6 yaşlarında yapılan bir araştırmada ise otizm şiddetinin kızlarda erkeklere oranla daha az şiddetlendiği belirtilmiştir (349). Ancak bu çalışmada çocukların aldığı tedavi bildirilmemiş ve otizmin kaynağı kesin olarak bilinmemektedir.

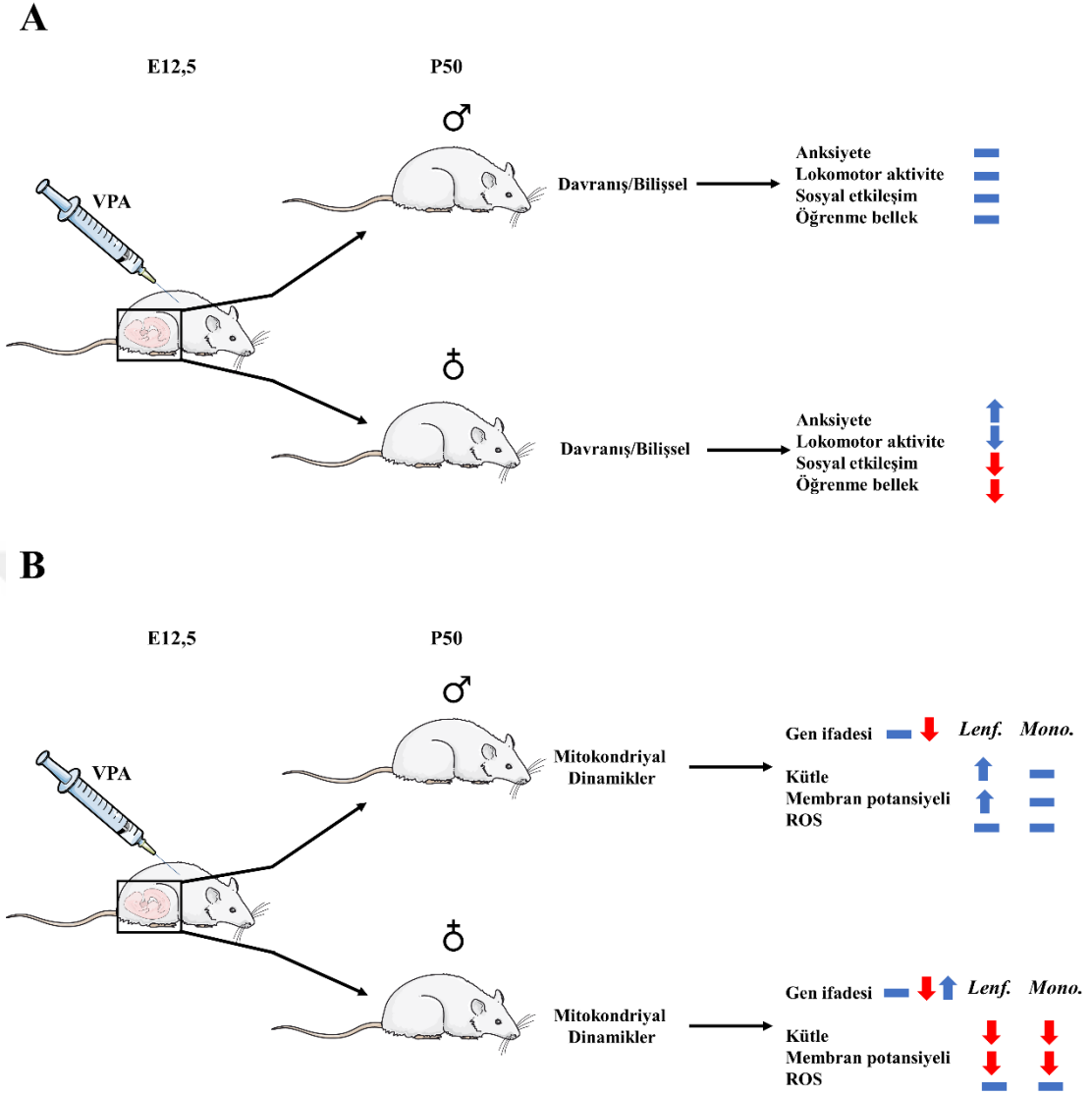
Postnatal 21. günde gözlenmeyip postnatal 50. günde gözlemlenen mitokondriyal dinamiklerdeki VPA kaynaklı değişiklikler, mitokondriyal dinamiklerin otizmin gelişim sürecinde bozulduğunu düşündürmektedir.

6 SONUÇ

Çalışmamızda, sıçanlarda VPA ile indüklenen otizm modelinde P21 grubunda cinsiyetten bağımsız olarak, sadece mitokondriyal dinamikler incelenirken, P50’de ise cinsiyetler arası bilişsel ve davranışsal faktörlerle birlikte kortikal mitokondriyal dinamikler ve lenfosit ve monositlerde mitokondriyal profili inceledik. VPA indüklü otizm modelinde dişi ve erkek hayvanlar eşlenik kontrol gruplarına göre, özellikle davranışsal/bilişsel testlerde farklı yanıtlar oluşmuştur. Bunun yanında, mitofaji ilişkili genler ve *COX IV* ifadesinde VPA grubunda benzer yanıtlar alınmıştır (P21’de benzer ifadeler görülürken, P50’de görülen farklar). Bir mitofüzyon geni olan *OPA1* ifadesi ise VPA grupları arasında cinsiyet açısından P50’de farklılık göstermiştir. Yanısıra, otistik sıçanlarda periferik kan dolaşımında inflamasyonun incelenmesinde kullanılan PBMC’ler mitokondriyal kütle, membran potansiyeli ve ROS miktarı arasında farklılıklar hem dönemsel hem de cinsiyet açısından fark göstermiştir. Çalışmada elde edilen sonuçların genel bir özeti Şekil 17 ve 18’de verilmiştir.



Şekil 17. P21’de periferik lenfosit ve monositlerdeki mitokondriyal dinamiklerin genel bir özeti.



Şekil 18. P50’de (A) davranışsal/bilişsel test sonuçlarının ve (B) mitokondriyal dinamiklerin genel bir özeti.

Çalışmamızın sonuçları, prenatal VPA maruziyetinin mitokondriyal disfonksiyona yol açıp otizm benzeri davranışlara sebep olabileceğini öngörmekte olup, bunun dişi ve erkek bireylerde farklılıklara yol açabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte PBMC mitokondriyal dinamiklerinde gerçekleşen bozukluklar cinsiyete bağlı olarak otizmde farklı şekillerde seyredabilmektedir. Postnatal 21. günde, mitokondriyal dinamiklerde değişiklik gözlenmeyip postnatal 50. günde değişiklik gözlenmesi, mitokondriyal dinamiklerin otizmin gelişim sürecinde bozulduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak, otizmde cinsiyet farklılıklarının neden

olduğu değişikliklerle ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakta ve PBMC'lerde gerçekleşen mitokondriyal dinamikler daha farklı çalışmalarla incelenmelidir.



7 KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association D-TF. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 2013.
2. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol*. 2015;56:155-69.
3. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47(8):921-9.
4. Rouillet FI, Lai JK, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol*. 2013;36:47-56.
5. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, et al. Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *N Engl J Med*. 2009;360(16):1597-605.
6. Boucher J, Mayes A, Bigham S. Memory in autistic spectrum disorder. *Psychol Bull*. 2012;138(3):458-96.
7. Fombonne E. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry*. 2002;7 Suppl 2:S4-6.
8. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr*. 1968;35(4):100-36.
9. APA. Diagnostic statistical manual of mental disorders. (Third edition) (DSM III). 1980.
10. APA. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed.) (DSM-IV). Washington DC; 1994.
11. Roehr B. American Psychiatric Association explains DSM-5. *Bmj*. 2013;346:f3591.
12. Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, et al. Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):5.
13. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Washington, DC: American psychiatric association 2013.
14. Lord C, Risi S, DiLavore PS, Shulman C, Thurm A, Pickles A. Autism from 2 to 9 years of age. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(6):694-701.
15. Risi S, Lord C, Gotham K, Corsello C, Chrysler C, Szatmari P, et al. Combining information from multiple sources in the diagnosis of autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006;45(9):1094-103.
16. Hodges H, Fealko C, Soares N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr*. 2020;9(Suppl 1):S55-s65.
17. Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017;56(6):466-74.
18. Brugha TS, Spiers N, Bankart J, Cooper SA, McManus S, Scott FJ, et al. Epidemiology of autism in adults across age groups and ability levels. *Br J Psychiatry*. 2016;209(6):498-503.
19. Zeidan J, Fombonne E, Scorch J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*. 2022;15(5):778-90.
20. Sauer AK, Stanton JE, Hans S, Grabrucker AM. Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology. In: Grabrucker AM, editor. *Autism Spectrum Disorders*. Brisbane (AU): Exon Publications Copyright: The Authors.; 2021.
21. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet*. 2008;9(5):341-55.
22. Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 2011;128(3):e488-95.
23. Genovese A, Butler MG. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
24. Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci*. 2011;15(9):409-16.
25. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet Med*. 2011;13(4):278-94.
26. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2017;135(1):29-41.
27. Karimi P, Kamali E, Mousavi SM, Karahmadi M. Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci*. 2017;22:27.
28. Emberti Gialloreti L, Mazzone L, Benvenuto A, Fasano A, Alcon AG, Kraneveld A, et al. Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. *J Clin Med*. 2019;8(2).

29. Hagemeyer S, Mangus K, Boeckers TM, Grabrucker AM. Effects of trace metal profiles characteristic for autism on synapses in cultured neurons. *Neural Plast.* 2015;2015:985083.
30. Careaga M, Murai T, Bauman MD. Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol Psychiatry.* 2017;81(5):391-401.
31. Bölte S, Girdler S, Marschik PB. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(7):1275-97.
32. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol.* 1996;370(2):247-61.
33. Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43(3):202-6.
34. Bescoby-Chambers N, Forster P, Bates G. 'Foetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association'. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43(12):847.
35. Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Jama.* 2013;309(16):1696-703.
36. Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism.* 2017;8:13.
37. Haar S, Berman S, Behrmann M, Dinstein I. Anatomical Abnormalities in Autism? *Cereb Cortex.* 2016;26(4):1440-52.
38. Nickl-Jockschat T, Habel U, Michel TM, Manning J, Laird AR, Fox PT, et al. Brain structure anomalies in autism spectrum disorder--a meta-analysis of VBM studies using anatomic likelihood estimation. *Hum Brain Mapp.* 2012;33(6):1470-89.
39. Mohammad-Rezazadeh I, Frohlich J, Loo SK, Jeste SS. Brain connectivity in autism spectrum disorder. *Curr Opin Neurol.* 2016;29(2):137-47.
40. Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ, et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum.* 2012;11(3):777-807.
41. Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, et al. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2007;81(6):1289-97.
42. Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet.* 2007;39(3):319-28.
43. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature.* 2014;515(7526):209-15.
44. Bagni C, Zukin RS. A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Neuron.* 2019;101(6):1070-88.
45. Guang S, Pang N, Deng X, Yang L, He F, Wu L, et al. Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:470.
46. Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics.* 2010;125 Suppl 1:S1-18.
47. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 2011;11:22.
48. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome.* 2017;5(1):10.
49. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One.* 2013;8(7):e68322.
50. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe.* 2010;16(4):444-53.
51. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One.* 2013;8(10):e76993.
52. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry.* 2016;21(6):738-48.
53. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1877-2013.

54. Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2012;17(3):290-314.
55. Farmer C, Thurm A, Grant P. Pharmacotherapy for the core symptoms in autistic disorder: current status of the research. *Drugs*. 2013;73(4):303-14.
56. Scahill L, Koenig K, Carroll DH, Pachler M. Risperidone approved for the treatment of serious behavioral problems in children with autism. *J Child Adolesc Psychiatr Nurs*. 2007;20(3):188-90.
57. Fieiras C, Chen MH, Escobar Liquitay CM, Meza N, Rojas V, Franco JVA, et al. Risperidone and aripiprazole for autism spectrum disorder in children: an overview of systematic reviews. *BMJ Evid Based Med*. 2022.
58. Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, Kern JK, Geier DA, Geier MR, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2016;76(4):257-68.
59. Bigaud M, Guerini D, Billich A, Bassilana F, Brinkmann V. Second generation S1P pathway modulators: research strategies and clinical developments. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(5):745-58.
60. Aoki M, Aoki H, Ramanathan R, Hait NC, Takabe K. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:8606878.
61. Alabdali A, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. A key role for an impaired detoxification mechanism in the etiology and severity of autism spectrum disorders. *Behav Brain Funct*. 2014;10:14.
62. Saresella M, Marventano I, Guerini FR, Mancuso R, Ceresa L, Zanzottera M, et al. An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biol Psychiatry*. 2009;66(10):978-84.
63. Jin C, Flavell RA. Inflammasome activation. The missing link: how the inflammasome senses oxidative stress. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(5):510-2.
64. Piancone F, Saresella M, Marventano I, La Rosa F, Zoppis M, Agostini S, et al. B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19+ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci Rep*. 2016;6:29699.
65. Mehta MV, Manson DK, Horn EM, Haythe J. An atypical presentation of adult-onset Still's disease complicated by pulmonary hypertension and macrophage activation syndrome treated with immunosuppression: a case-based review of the literature. *Pulm Circ*. 2016;6(1):136-42.
66. Gkikas I, Palikaras K, Tavernarakis N. The Role of Mitophagy in Innate Immunity. *Front Immunol*. 2018;9:1283.
67. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet*. 2014;94(5):677-94.
68. Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, Sousa AA, et al. PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *J Neurosci*. 2011;31(17):6329-38.
69. Yuan A, Sershen H, Veeranna, Basavarajappa BS, Kumar A, Hashim A, et al. Neurofilament subunits are integral components of synapses and modulate neurotransmission and behavior in vivo. *Mol Psychiatry*. 2015;20(8):986-94.
70. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017;1858(8):602-14.
71. Ma Y, Wang L, Jia R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers. *Am J Cancer Res*. 2020;10(5):1278-93.
72. Chan DC. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:235-59.
73. Vázquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel BA, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol*. 2016;594(3):509-25.
74. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*. 1995;25(1):63-77.
75. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *Jama*. 2014;311(17):1770-7.
76. Coleman M, Blass JP. Autism and lactic acidosis. *J Autism Dev Disord*. 1985;15(1):1-8.
77. Lombard J. Autism: a mitochondrial disorder? *Med Hypotheses*. 1998;50(6):497-500.
78. Schwede M, Nagpal S, Gandal MJ, Parikshak NN, Mirnic K, Geschwind DH, et al. Strong correlation of downregulated genes related to synaptic transmission and mitochondria in post-mortem autism cerebral cortex. *J Neurodev Disord*. 2018;10(1):18.
79. Siddiqui MF, Elwell C, Johnson MH. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Autism Open Access*. 2016;6(5).

80. Gandal MJ, Edgar JC, Klook K, Siegel SJ. Gamma synchrony: towards a translational biomarker for the treatment-resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012;62(3):1504-18.
81. Frye RE. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: Unique Abnormalities and Targeted Treatments. *Semin Pediatr Neurol*. 2020;35:100829.
82. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*. 2012;46:265-87.
83. Santos D, Esteves AR, Silva DF, Januário C, Cardoso SM. The Impact of Mitochondrial Fusion and Fission Modulation in Sporadic Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2015;52(1):573-86.
84. Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 1997;90(1):121-9.
85. Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*. 2003;14(6):2342-56.
86. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(10):1833-8.
87. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No. 2:R283-9.
88. Kornfeld OS, Qvit N, Haileselassie B, Shamloo M, Bernardi P, Mochly-Rosen D. Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo. *Sci Rep*. 2018;8(1):14034.
89. Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission: regulation and ER connection. *Mol Cells*. 2014;37(2):89-94.
90. Gao AW, Cantó C, Houtkooper RH. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):580-9.
91. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):458-67.
92. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):814-22.
93. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14.
94. Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *Febs j*. 2017;284(2):183-95.
95. Martinez-Vicente M. Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:64.
96. Onishi M, Yamano K, Sato M, Matsuda N, Okamoto K. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *Embo j*. 2021;40(3):e104705.
97. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-96.
98. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, et al. Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 2012;522(2):134-8.
99. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524(7565):309-14.
100. Bennuri SC, Rose S, Frye RE. Mitochondrial Dysfunction Is Inducible in Lymphoblastoid Cell Lines From Children With Autism and May Involve the TORC1 Pathway. *Front Psychiatry*. 2019;10:269.
101. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(12):1701-20.
102. Grimm A, Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem*. 2017;143(4):418-31.
103. Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging*. 2004;25(1):105-10.
104. Bajic D, Commons KG, Soriano SG. Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(4):258-66.
105. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97.
106. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):440-50.
107. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 2006;125(7):1241-52.

108. Ko HJ, Tsai CY, Chiou SJ, Lai YL, Wang CH, Cheng JT, et al. The Phosphorylation Status of Drp1-Ser637 by PKA in Mitochondrial Fission Modulates Mitophagy via PINK1/Parkin to Exert Multipolar Spindles Assembly during Mitosis. *Biomolecules*. 2021;11(3).
109. Touvier T, De Palma C, Rigamonti E, Scagliola A, Incerti E, Mazelin L, et al. Muscle-specific Drp1 overexpression impairs skeletal muscle growth via translational attenuation. *Cell Death Dis*. 2015;6(2):e1663.
110. Corrado M, Scorrano L, Campello S. Mitochondrial dynamics in cancer and neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:729290.
111. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol*. 2013;23(2):64-71.
112. Vance JM. The many faces of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol*. 2000;57(5):638-40.
113. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004;36(5):449-51.
114. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet*. 1998;35(10):793-800.
115. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13843-55.
116. Lutz AK, Exner N, Fett ME, Schlehe JS, Kloos K, Lämmermann K, et al. Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22938-51.
117. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*. 2009;324(5923):102-5.
118. Shirendeb UP, Calkins MJ, Manczak M, Anekonda V, Dufour B, McBride JL, et al. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2012;21(2):406-20.
119. Bernard-Marissal N, van Hameren G, Juneja M, Pellegrino C, Louhivuori L, Bartesaghi L, et al. Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(6):2328-37.
120. Martin AM, Maradei SJ, Velasco HM. Charcot Marie Tooth disease (CMT4A) due to GDAP1 mutation: report of a Colombian family. *Colomb Med (Cali)*. 2015;46(4):194-8.
121. Wang W, Hou J, Zhu Z, Fang H. Is Mitochondrial Cell Fragility a Cell Weakness? *Adv Exp Med Biol*. 2017;1038:107-16.
122. Cho B, Choi SY, Cho HM, Kim HJ, Sun W. Physiological and pathological significance of dynamin-related protein 1 (drp1)-dependent mitochondrial fission in the nervous system. *Exp Neurobiol*. 2013;22(3):149-57.
123. Reddy PH, Oliver DM. Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease. *Cells*. 2019;8(5).
124. Ho DH, Je AR, Lee H, Son I, Kweon HS, Kim HG, et al. LRRK2 Kinase Activity Induces Mitochondrial Fission in Microglia via Drp1 and Modulates Neuroinflammation. *Exp Neurobiol*. 2018;27(3):171-80.
125. Li Z, Zhu YX, Gu LJ, Cheng Y. Understanding autism spectrum disorders with animal models: applications, insights, and perspectives. *Zool Res*. 2021;42(6):800-24.
126. Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*. 1998;392(6679):917-20.
127. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-521.
128. Zhao H, Jiang YH, Zhang YQ. Modeling autism in non-human primates: Opportunities and challenges. *Autism Res*. 2018;11(5):686-94.
129. Topál J, Román V, Turcsán B. The dog (*Canis familiaris*) as a translational model of autism: It is high time we move from promise to reality. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*. 2019;10(4):e1495.
130. Ng MC, Yang YL, Lu KT. Behavioral and synaptic circuit features in a zebrafish model of fragile X syndrome. *PLoS One*. 2013;8(3):e51456.
131. Kim OH, Cho HJ, Han E, Hong TI, Ariyasiri K, Choi JH, et al. Zebrafish knockout of Down syndrome gene, *DYRK1A*, shows social impairments relevant to autism. *Mol Autism*. 2017;8:50.

132. Rea V, Van Raay TJ. Using Zebrafish to Model Autism Spectrum Disorder: A Comparison of ASD Risk Genes Between Zebrafish and Their Mammalian Counterparts. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:575575.
133. Tian Y, Zhang ZC, Han J. Drosophila Studies on Autism Spectrum Disorders. *Neurosci Bull.* 2017;33(6):737-46.
134. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell.* 2020;180(3):568-84.e23.
135. Wu Y, Zhong W, Cui N, Johnson CM, Xing H, Zhang S, et al. Characterization of Rett Syndrome-like phenotypes in Mecp2-knockout rats. *J Neurodev Disord.* 2016;8:23.
136. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23(2):185-8.
137. Li CH, Coffey EL, Dall'Agnese A, Hannett NM, Tang X, Henninger JE, et al. MeCP2 links heterochromatin condensates and neurodevelopmental disease. *Nature.* 2020;586(7829):440-4.
138. Orefice LL, Mosko JR, Morency DT, Wells MF, Tasnim A, Mozeika SM, et al. Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. *Cell.* 2019;178(4):867-86.e24.
139. Pizzamiglio L, Focchi E, Cambria C, Ponzoni L, Ferrara S, Bifari F, et al. The DNA repair protein ATM as a target in autism spectrum disorder. *JCI Insight.* 2021;6(3).
140. Richter JD, Zhao X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2021;22(4):209-22.
141. He CX, Cantu DA, Mantri SS, Zeiger WA, Goel A, Portera-Cailliau C. Tactile Defensiveness and Impaired Adaptation of Neuronal Activity in the Fmr1 Knock-Out Mouse Model of Autism. *J Neurosci.* 2017;37(27):6475-87.
142. Tataavarty V, Torrado Pacheco A, Groves Kuhnle C, Lin H, Koundinya P, Miska NJ, et al. Autism-Associated Shank3 Is Essential for Homeostatic Compensation in Rodent V1. *Neuron.* 2020;106(5):769-77.e4.
143. Wang ZJ, Zhong P, Ma K, Seo JS, Yang F, Hu Z, et al. Amelioration of autism-like social deficits by targeting histone methyltransferases EHMT1/2 in Shank3-deficient mice. *Mol Psychiatry.* 2020;25(10):2517-33.
144. Wang X, Bey AL, Katz BM, Badea A, Kim N, David LK, et al. Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat Commun.* 2016;7:11459.
145. Jaramillo TC, Xuan Z, Reimers JM, Escamilla CO, Liu S, Powell CM. Early Restoration of Shank3 Expression in Shank3 Knock-Out Mice Prevents Core ASD-Like Behavioral Phenotypes. *eNeuro.* 2020;7(3).
146. Lam HC, Siroky BJ, Henske EP. Renal disease in tuberous sclerosis complex: pathogenesis and therapy. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(11):704-16.
147. Reith RM, McKenna J, Wu H, Hashmi SS, Cho SH, Dash PK, et al. Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis.* 2013;51:93-103.
148. Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, et al. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature.* 2012;488(7413):647-51.
149. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature.* 2010;466(7304):368-72.
150. Baron CA, Tepper CG, Liu SY, Davis RR, Wang NJ, Schanen NC, et al. Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin-proteasome pathway processes. *Hum Mol Genet.* 2006;15(6):853-69.
151. Smith SE, Zhou YD, Zhang G, Jin Z, Stoppel DC, Anderson MP. Increased gene dosage of Ube3a results in autism traits and decreased glutamate synaptic transmission in mice. *Sci Transl Med.* 2011;3(103):103ra97.
152. Xu X, Li C, Gao X, Xia K, Guo H, Li Y, et al. Excessive UBE3A dosage impairs retinoic acid signaling and synaptic plasticity in autism spectrum disorders. *Cell Res.* 2018;28(1):48-68.
153. Südhof TC. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature.* 2008;455(7215):903-11.
154. Südhof TC. Synaptic Neuroligin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell.* 2017;171(4):745-69.

155. Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, et al. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci*. 2010;30(6):2115-29.
156. Nakanishi M, Nomura J, Ji X, Tamada K, Arai T, Takahashi E, et al. Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLoS Genet*. 2017;13(8):e1006940.
157. Wöhr M, Silverman JL, Scattoni ML, Turner SM, Harris MJ, Saxena R, et al. Developmental delays and reduced pup ultrasonic vocalizations but normal sociability in mice lacking the postsynaptic cell adhesion protein neuroligin2. *Behav Brain Res*. 2013;251:50-64.
158. Modi B, Pimpinella D, Pazienti A, Zacchi P, Cherubini E, Griguoli M. Possible Implication of the CA2 Hippocampal Circuit in Social Cognition Deficits Observed in the Neuroligin 3 Knock-Out Mouse, a Non-Syndromic Animal Model of Autism. *Front Psychiatry*. 2019;10:513.
159. Rothwell PE, Fuccillo MV, Maxeiner S, Hayton SJ, Gokce O, Lim BK, et al. Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell*. 2014;158(1):198-212.
160. Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, et al. Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*. 2003;423(6943):939-48.
161. Saint-Martin M, Joubert B, Pellier-Monnin V, Pascual O, Noraz N, Honnorat J. Contactin-associated protein-like 2, a protein of the neurexin family involved in several human diseases. *Eur J Neurosci*. 2018;48(3):1906-23.
162. Scott KE, Kazazian K, Mann RS, Möhrle D, Schormans AL, Schmid S, et al. Loss of Cntnap2 in the Rat Causes Autism-Related Alterations in Social Interactions, Stereotypic Behavior, and Sensory Processing. *Autism Res*. 2020;13(10):1698-717.
163. Cotney J, Muhle RA, Sanders SJ, Liu L, Willsey AJ, Niu W, et al. The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat Commun*. 2015;6:6404.
164. Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, et al. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell*. 2014;158(2):263-76.
165. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, et al. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*. 2016;537(7622):675-9.
166. O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egerton JD, Stanaway IB, Phelps IG, et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*. 2012;338(6114):1619-22.
167. Platt RJ, Zhou Y, Slaymaker IM, Shetty AS, Weisbach NR, Kim JA, et al. Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell Rep*. 2017;19(2):335-50.
168. Jung H, Park H, Choi Y, Kang H, Lee E, Kweon H, et al. Sexually dimorphic behavior, neuronal activity, and gene expression in Chd8-mutant mice. *Nat Neurosci*. 2018;21(9):1218-28.
169. Suliman-Lavie R, Title B, Cohen Y, Hamada N, Tal M, Tal N, et al. Pogz deficiency leads to transcription dysregulation and impaired cerebellar activity underlying autism-like behavior in mice. *Nat Commun*. 2020;11(1):5836.
170. Cunniff MM, Markenscoff-Papadimitriou E, Ostrowski J, Rubenstein JL, Sohal VS. Altered hippocampal-prefrontal communication during anxiety-related avoidance in mice deficient for the autism-associated gene Pogz. *Elife*. 2020;9.
171. Matsumura K, Seiriki K, Okada S, Nagase M, Ayabe S, Yamada I, et al. Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes. *Nat Commun*. 2020;11(1):859.
172. Yang R, Walder-Christensen KK, Kim N, Wu D, Lorenzo DN, Badea A, et al. ANK2 autism mutation targeting giant ankyrin-B promotes axon branching and ectopic connectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(30):15262-71.
173. Carter MT, Nikkel SM, Fernandez BA, Marshall CR, Noor A, Lionel AC, et al. Hemizygous deletions on chromosome 1p21.3 involving the DPYD gene in individuals with autism spectrum disorder. *Clin Genet*. 2011;80(5):435-43.
174. D'Angelo CS, Moller Dos Santos MF, Alonso LG, Koiffmann CP. Two New Cases of 1p21.3 Deletions and an Unbalanced Translocation t(8;12) among Individuals with Syndromic Obesity. *Mol Syndromol*. 2015;6(2):63-70.
175. Tucci A, Ciaccio C, Scuvera G, Esposito S, Milani D. MIR137 is the key gene mediator of the syndromic obesity phenotype of patients with 1p21.3 microdeletions. *Mol Cytogenet*. 2016;9:80.
176. Cheng Y, Wang ZM, Tan W, Wang X, Li Y, Bai B, et al. Partial loss of psychiatric risk gene Mir137 in mice causes repetitive behavior and impairs sociability and learning via increased Pde10a. *Nat Neurosci*. 2018;21(12):1689-703.

177. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med.* 2008;358(7):667-75.
178. Bertero A, Liska A, Pagani M, Parolisi R, Masferrer ME, Gritti M, et al. Autism-associated 16p11.2 microdeletion impairs prefrontal functional connectivity in mouse and human. *Brain.* 2018;141(7):2055-65.
179. Cheroni C, Caporale N, Testa G. Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment: contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology. *Mol Autism.* 2020;11(1):69.
180. Hertz-Picciotto I, Schmidt RJ, Krakowiak P. Understanding environmental contributions to autism: Causal concepts and the state of science. *Autism Res.* 2018;11(4):554-86.
181. Meeking MM, MacFabe DF, Mephram JR, Foley KA, Tichenoff LJ, Boon FH, et al. Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020;97:109794.
182. Thongkorn S, Kanlayaprasit S, Panjabud P, Saeliw T, Jantheang T, Kasitipradit K, et al. Sex differences in the effects of prenatal bisphenol A exposure on autism-related genes and their relationships with the hippocampus functions. *Sci Rep.* 2021;11(1):1241.
183. Wolstenholme JT, Drobná Z, Henriksen AD, Goldsby JA, Stevenson R, Irvin JW, et al. Transgenerational Bisphenol A Causes Deficits in Social Recognition and Alters Postsynaptic Density Genes in Mice. *Endocrinology.* 2019;160(8):1854-67.
184. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology.* 2009;110(3):628-37.
185. Wang HV, Forestier S, Corces VG. Exposure to sevoflurane results in changes of transcription factor occupancy in sperm and inheritance of autism†. *Biol Reprod.* 2021;105(3):705-19.
186. Sacco R, Curatolo P, Manzi B, Militerni R, Bravaccio C, Frolli A, et al. Principal pathogenetic components and biological endophenotypes in autism spectrum disorders. *Autism Res.* 2010;3(5):237-52.
187. Zimmerman AW, Connors SL, Matteson KJ, Lee LC, Singer HS, Castaneda JA, et al. Maternal anti-brain antibodies in autism. *Brain Behav Immun.* 2007;21(3):351-7.
188. Haddad FL, Patel SV, Schmid S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;113:546-67.
189. Braunschweig D, Golub MS, Koenig CM, Qi L, Pessah IN, Van de Water J, et al. Maternal autism-associated IgG antibodies delay development and produce anxiety in a mouse gestational transfer model. *J Neuroimmunol.* 2012;252(1-2):56-65.
190. Tomonaga K, Kobayashi T, Ikuta K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 2002;4(4):491-500.
191. Pletnikov MV, Moran TH, Carbone KM. Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. *Front Biosci.* 2002;7:d593-607.
192. Wu WL, Adame MD, Liou CW, Barlow JT, Lai TT, Sharon G, et al. Microbiota regulate social behaviour via stress response neurons in the brain. *Nature.* 2021;595(7867):409-14.
193. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell.* 2019;177(6):1600-18.e17.
194. Emrich HM, von Zerssen D, Kissling W, Möller HJ, Windorfer A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. *Arch Psychiatr Nervenkr (1970).* 1980;229(1):1-16.
195. Löscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs.* 2002;16(10):669-94.
196. Werler MM, Ahrens KA, Bosco JL, Mitchell AA, Anderka MT, Gilboa SM, et al. Use of antiepileptic medications in pregnancy in relation to risks of birth defects. *Ann Epidemiol.* 2011;21(11):842-50.
197. Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ, et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47(8):551-5.
198. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology.* 2008;71(23):1923-4.

199. Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(1):91-103.
200. Moldrich RX, Leange G, She D, Dolan-Evans E, Nelson M, Reza N, et al. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav Brain Res.* 2013;257:253-64.
201. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol.* 2009;28(1):1-10.
202. Kim KC, Lee DK, Go HS, Kim P, Choi CS, Kim JW, et al. Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):512-28.
203. Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, et al. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res.* 2009;65(1):35-43.
204. Miyazaki K, Narita N, Narita M. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23(2-3):287-97.
205. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(1):80-9.
206. Rouillet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience.* 2010;170(2):514-22.
207. Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol.* 2015;24(4):285-300.
208. Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol.* 2000;22(3):319-24.
209. Sui L, Chen M. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. *Brain Res Bull.* 2012;87(6):556-63.
210. Piven J, Elison JT, Zylka MJ. Toward a conceptual framework for early brain and behavior development in autism. *Mol Psychiatry.* 2017;22(10):1385-94.
211. Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, Zaman F, Mahmud Reza H. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. *Behav Brain Res.* 2015;286:112-21.
212. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(6):728-40.
213. Kazlauskas N, Campolongo M, Lucchina L, Zappala C, Depino AM. Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;72:11-21.
214. Weinstein-Fudim L, Ergaz Z, Turgeman G, Yanai J, Szyf M, Ornoy A. Gender Related Changes in Gene Expression Induced by Valproic Acid in A Mouse Model of Autism and the Correction by S-adenosyl Methionine. Does It Explain the Gender Differences in Autistic Like Behavior? *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
215. Wolf A, Bauer B, Abner EL, Ashkenazy-Frolinger T, Hartz AM. A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147733.
216. Feyissa DD, Aher YD, Engidawork E, Höger H, Lubec G, Korz V. Individual Differences in Male Rats in a Behavioral Test Battery: A Multivariate Statistical Approach. *Front Behav Neurosci.* 2017;11:26.
217. Kim JW, Seung H, Kim KC, Gonzales ELT, Oh HA, Yang SM, et al. Agmatine rescues autistic behaviors in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology.* 2017;113(Pt A):71-81.
218. Sonzogni M, Wallaard I, Santos SS, Kingma J, du Mee D, van Woerden GM, et al. A behavioral test battery for mouse models of Angelman syndrome: a powerful tool for testing drugs and novel Ube3a mutants. *Mol Autism.* 2018;9:47.
219. Bali YA, Kaikai NE, Ba-M'hamed S, Bennis M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology.* 2019;415:18-25.
220. Mehta MV, Gandal MJ, Siegel SJ. mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *PLoS One.* 2011;6(10):e26077.

221. Boucher J. *The autistic spectrum: Characteristics, causes and practical issues*: Sage; 2008.
222. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47-60.
223. Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry*. 2010;68(12):1100-6.
224. Ren R, Zhang Y, Li B, Wu Y, Li B. Effect of β -amyloid (25-35) on mitochondrial function and expression of mitochondrial permeability transition pore proteins in rat hippocampal neurons. *J Cell Biochem*. 2011;112(5):1450-7.
225. Walters MW, Bjork JA, Wallace KB. Perfluorooctanoic acid stimulated mitochondrial biogenesis and gene transcription in rats. *Toxicology*. 2009;264(1-2):10-5.
226. Chaanine AH, Jeong D, Liang L, Chemaly ER, Fish K, Gordon RE, et al. JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure. *Cell Death Dis*. 2012;3(2):265.
227. Zhou L, Zhang L, Zhang Y, Yu X, Sun X, Zhu T, et al. PINK1 Deficiency Ameliorates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Front Physiol*. 2019;10:1225.
228. Chen Z, Fu Q, Shen B, Huang X, Wang K, He P, et al. Enhanced p62 expression triggers concomitant autophagy and apoptosis in a rat chronic spinal cord compression model. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2091-6.
229. Dietert RR, Dietert JM, Dewitt JC. Environmental risk factors for autism. *Emerg Health Threats J*. 2011;4:7111.
230. Melancia F, Schiavi S, Servadio M, Cartocci V, Campolongo P, Palmery M, et al. Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. *Br J Pharmacol*. 2018;175(18):3699-712.
231. Bambini-Junior V, Baronio D, MacKenzie J, Zanatta G, Riesgo RdS, Gottfried C. Prenatal Exposure to Valproate in Animals and Autism. In: Patel VB, Preedy VR, Martin CR, editors. *Comprehensive Guide to Autism*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 1779-93.
232. Bristot Silvestrin R, Bambini-Junior V, Galland F, Daniele Bobermim L, Quincozes-Santos A, Torres Abib R, et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res*. 2013;1495:52-60.
233. Ranger P, Ellenbroek BA. Perinatal Influences of Valproate on Brain and Behaviour: An Animal Model for Autism. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016;29:363-86.
234. Tartaglione AM, Schiavi S, Calamandrei G, Trezza V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 2019;159:107477.
235. Fritz AK, Amrein I, Wolfer DP. Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2017;175(3):380-91.
236. Knight P, Chellian R, Wilson R, Behnood-Rod A, Panunzio S, Bruijnzeel AW. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2021;204:173168.
237. Blizard DA, Lippman HR, Chen JJ. Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol Behav*. 1975;14(5):601-8.
238. Scholl JL, Afzal A, Fox LC, Watt MJ, Forster GL. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiol Behav*. 2019;211:112670.
239. Kim JW, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, et al. Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PLoS One*. 2014;9(8):e104927.
240. Morales-Dionisio O, de la Cruz F, Franco-Colín M, Hidalgo-Alegría O, Flores G, Luna-Muñoz J, et al. Differential Effects of Valproic Acid on Immobility Responses and Locomotor Activity in Female and Male Rats. *Pharmacology & Pharmacy*. 2017;8(10):339.
241. Mony TJ, Lee JW, Dreyfus C, DiCicco-Bloom E, Lee HJ. Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Autistic-like Behaviors in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2016;14(4):338-44.
242. Kerr DM, Downey L, Conboy M, Finn DP, Roche M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. *Behav Brain Res*. 2013;249:124-32.

243. Kerr DM, Gilmartin A, Roche M. Pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase attenuates social behavioural deficits in male rats prenatally exposed to valproic acid. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):228-35.
244. Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Fernagut PO, et al. Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(9):871-82.
245. Dai YC, Zhang HF, Schön M, Böckers TM, Han SP, Han JS, et al. Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:355.
246. Scott-Van Zeeland AA, Dapretto M, Ghahremani DG, Poldrack RA, Bookheimer SY. Reward processing in autism. *Autism Res.* 2010;3(2):53-67.
247. Chevallier C, Kohls G, Troiani V, Brodtkin ES, Schultz RT. The social motivation theory of autism. *Trends Cogn Sci.* 2012;16(4):231-9.
248. Ameis SH, Catani M. Altered white matter connectivity as a neural substrate for social impairment in Autism Spectrum Disorder. *Cortex.* 2015;62:158-81.
249. Pavál D, Rad F, Rusu R, Niculae A, Colosi HA, Dobrescu I, et al. Low Retinal Dehydrogenase 1 (RALDH1) Level in Prepubertal Boys with Autism Spectrum Disorder: A Possible Link to Dopamine Dysfunction? *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017;15(3):229-36.
250. Mirza R, Sharma B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. *Brain Res Bull.* 2019;147:36-46.
251. Kumar H, Sharma B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res.* 2016;1630:83-97.
252. Seiffe A, Ramírez MF, Sempé L, Depino AM. Juvenile handling rescues autism-related effects of prenatal exposure to valproic acid. *Sci Rep.* 2022;12(1):7174.
253. Fereshetyan K, Chavushyan V, Danielyan M, Yenkovyan K. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2021;11(1):23471.
254. Elnahas EM, Abuelezz SA, Mohamad MI, Nabil MM, Abdelraouf SM, Bahaa N, et al. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021;108:110185.
255. Ishola IO, Balogun AO, Adeyemi OO. Novel potential of metformin on valproic acid-induced autism spectrum disorder in rats: involvement of antioxidant defence system. *Fundam Clin Pharmacol.* 2020;34(6):650-61.
256. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res.* 2013;1526:15-25.
257. Ghahremani R, Mohammadkhani R, Salehi I, Karimi SA, Zarei M. Sex Differences in Spatial Learning and Memory in Valproic Acid Rat Model of Autism: Possible Beneficial Role of Exercise Interventions. *Front Behav Neurosci.* 2022;16:869792.
258. Safari S, Ahmadi N, Mohammadkhani R, Ghahremani R, Khajvand-Abenedi M, Shahidi S, et al. Sex differences in spatial learning and memory and hippocampal long-term potentiation at perforant pathway-dentate gyrus (PP-DG) synapses in Wistar rats. *Behav Brain Funct.* 2021;17(1):9.
259. Markram K, Rinaldi T, La Mendola D, Sandi C, Markram H. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(4):901-12.
260. Sailer L, Duclot F, Wang Z, Kabbaj M. Consequences of prenatal exposure to valproic acid in the socially monogamous prairie voles. *Sci Rep.* 2019;9(1):2453.
261. Anagnostou E, Soorya L, Chaplin W, Bartz J, Halpern D, Wasserman S, et al. Intranasal oxytocin versus placebo in the treatment of adults with autism spectrum disorders: a randomized controlled trial. *Mol Autism.* 2012;3(1):16.
262. Jones C, Barrera I, Brothers S, Ring R, Wahlestedt C. Oxytocin and social functioning. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017;19(2):193-201.
263. Zhang R, Xu XJ, Zhang HF, Han SP, Han JS. The Role of the Oxytocin/Arginine Vasopressin System in Animal Models of Autism Spectrum Disorder. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;224:135-58.
264. Preti A, Melis M, Siddi S, Vellante M, Doneddu G, Fadda R. Oxytocin and autism: a systematic review of randomized controlled trials. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2014;24(2):54-68.
265. DeMayo MM, Young LJ, Hickie IB, Song YJC, Guastella AJ. Circuits for social learning: A unified model and application to Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;107:388-98.

266. László K, Kiss O, Vörös D, Mintál K, Ollmann T, Péczely L, et al. Intraamygdaloid Oxytocin Reduces Anxiety in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines*. 2022;10(2).
267. John S, Jaeggi AV. Oxytocin levels tend to be lower in autistic children: A meta-analysis of 31 studies. *Autism*. 2021;25(8):2152-61.
268. Marazziti D, Baroni S, Mucci F, Piccinni A, Moroni I, Giannaccini G, et al. Sex-Related Differences in Plasma Oxytocin Levels in Humans. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2019;15:58-63.
269. Valacchi G, Virgili F, Cervellati C, Pecorelli A. OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front Physiol*. 2018;9:858.
270. Chen Y, Zhou Z, Min W. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Front Physiol*. 2018;9:1487.
271. Baker N, Patel J, Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion*. 2019;49:259-68.
272. Huizing M, Ruitenbeek W, Thinnis FP, DePinto V, Wendel U, Trijbels FJ, et al. Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy. *Pediatr Res*. 1996;39(5):760-5.
273. Anflous K, Armstrong DD, Craigen WJ. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem*. 2001;276(3):1954-60.
274. Anflous-Pharayra K, Lee N, Armstrong DL, Craigen WJ. VDAC3 has differing mitochondrial functions in two types of striated muscles. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(1):150-6.
275. Shoshan-Barmatz V, Shteinifer-Kuzmine A, Verma A. VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(11).
276. McEnery MW, Dawson TM, Verma A, Gurley D, Colombini M, Snyder SH. Mitochondrial voltage-dependent anion channel. Immunochemical and immunohistochemical characterization in rat brain. *J Biol Chem*. 1993;268(31):23289-96.
277. Langen M, Durston S, Staal WG, Palmen SJ, van Engeland H. Caudate nucleus is enlarged in high-functioning medication-naïve subjects with autism. *Biol Psychiatry*. 2007;62(3):262-6.
278. Kern JK. The possible role of the cerebellum in autism/PDD: disruption of a multisensory feedback loop. *Med Hypotheses*. 2002;59(3):255-60.
279. Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M, et al. Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord*. 1995;25(1):1-18.
280. Gong W, Liao W, Fang C, Liu Y, Xie H, Yi F, et al. Analysis of Chronic Mild Stress-Induced Hypothalamic Proteome: Identification of Protein Dysregulations Associated With Vulnerability and Resiliency to Depression or Anxiety. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:633398.
281. Baghel MS, Thakur MK. Vdac1 Downregulation Causes Mitochondrial Disintegration Leading to Hippocampal Neurodegeneration in Scopolamine-Induced Amnesic Mice. *Mol Neurobiol*. 2019;56(3):1707-18.
282. Chauhan A, Gu F, Chauhan V. Mitochondrial respiratory chain defects in autism and other neurodevelopmental disorders. *Journal of Pediatric Biochemistry*. 2012;2(4):213-23.
283. Guevara-Campos J, González-Guevara L, Briones P, López-Gallardo E, Bulán N, Ruiz-Pesini E, et al. Autism associated to a deficiency of complexes III and IV of the mitochondrial respiratory chain. *Invest Clin*. 2010;51(3):423-31.
284. Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lécart S, Fontaine-Aupart MP, Hoebeke M. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(10):1790-800.
285. Webster KA, Graham RM, Bishopric NH. BNIP3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(1):35-45.
286. Yuan C, Pu L, He Z, Wang J. BNIP3/Bcl-2-mediated apoptosis induced by cyclic tensile stretch in human cartilage endplate-derived stem cells. *Exp Ther Med*. 2018;15(1):235-41.
287. Jin Q, Li R, Hu N, Xin T, Zhu P, Hu S, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways. *Redox Biol*. 2018;14:576-87.
288. Schmid ET, Pyo J-H, Walker DW. Neuronal induction of BNIP3-mediated mitophagy slows systemic aging in *Drosophila*. *Nature Aging*. 2022.
289. Park CW, Hong SM, Kim ES, Kwon JH, Kim KT, Nam HG, et al. BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK. *Autophagy*. 2013;9(3):345-60.

290. Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson Å B. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem.* 2012;287(23):19094-104.
291. Newell C, Shutt TE, Ahn Y, Hittel DS, Khan A, Rho JM, et al. Tissue Specific Impacts of a Ketogenic Diet on Mitochondrial Dynamics in the BTBR(T+tf/j) Mouse. *Front Physiol.* 2016;7:654.
292. Gaweda-Walerych K, Sitek EJ, Narożańska E, Buratti E. Parkin beyond Parkinson's Disease-A Functional Meaning of Parkin Downregulation in TDP-43 Proteinopathies. *Cells.* 2021;10(12).
293. Ham SJ, Lee D, Yoo H, Jun K, Shin H, Chung J. Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(8):4281-91.
294. Scheuerle A, Wilson K. PARK2 copy number aberrations in two children presenting with autism spectrum disorder: further support of an association and possible evidence for a new microdeletion/microduplication syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156b(4):413-20.
295. Yin CL, Chen HI, Li LH, Chien YL, Liao HM, Chou MC, et al. Genome-wide analysis of copy number variations identifies PARK2 as a candidate gene for autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2016;7:23.
296. Balachandar V, Rajagopalan K, Jayaramayya K, Jeevanandam M, Iyer M. Mitochondrial dysfunction: A hidden trigger of autism? *Genes Dis.* 2021;8(5):629-39.
297. Chen S, Zhou L, Zhang Y, Leng Y, Pei XY, Lin H, et al. Targeting SQSTM1/p62 induces cargo loading failure and converts autophagy to apoptosis via NBK/Bik. *Mol Cell Biol.* 2014;34(18):3435-49.
298. Seibenhener ML, Du Y, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MC, Wooten MW. A role for sequestosome 1/p62 in mitochondrial dynamics, import and genome integrity. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(3):452-9.
299. Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy.* 2010;6(8):1090-106.
300. Yamada T, Murata D, Adachi Y, Itoh K, Kameoka S, Igarashi A, et al. Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2018;28(4):588-604.e5.
301. Yamada T, Dawson TM, Yanagawa T, Iijima M, Sesaki H. SQSTM1/p62 promotes mitochondrial ubiquitination independently of PINK1 and PRKN/parkin in mitophagy. *Autophagy.* 2019;15(11):2012-8.
302. Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci.* 2012;32(30):10413-22.
303. Agam G, Taylor Z, Vainer E, Golan HM. The influence of choline treatment on behavioral and neurochemical autistic-like phenotype in Mthfr-deficient mice. *Transl Psychiatry.* 2020;10(1):316.
304. Hui KK, Tanaka M. Autophagy links MTOR and GABA signaling in the brain. *Autophagy.* 2019;15(10):1848-9.
305. Nicolini C, Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol.* 2018;299(Pt A):217-27.
306. Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 2010;1309:83-94.
307. Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron.* 2014;83(5):1131-43.
308. Bowling H, Klann E. Shaping dendritic spines in autism spectrum disorder: mTORC1-dependent macroautophagy. *Neuron.* 2014;83(5):994-6.
309. Dana H, Bayramov KK, Delibaşı N, Tahtasakal R, Bayramov R, Hamurcu Z, et al. Disregulation of Autophagy in the Transgenerational Cc2d1a Mouse Model of Autism. *Neuromolecular Med.* 2020;22(2):239-49.
310. Kim HJ, Cho MH, Shim WH, Kim JK, Jeon EY, Kim DH, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol Psychiatry.* 2017;22(11):1576-84.
311. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* 2016;49(8):424-30.
312. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014;53(2):167-78.

313. Zhang J, Zhang JX, Zhang QL. PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy in the development of autism spectrum disorder. *Brain Res Bull.* 2016;125:152-8.
314. Lieberman OJ, Cartocci V, Pigulevskiy I, Molinari M, Carbonell J, Broseta MB, et al. mTOR Suppresses Macroautophagy During Striatal Postnatal Development and Is Hyperactive in Mouse Models of Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:70.
315. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 2003;160(2):189-200.
316. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 2000;26(2):211-5.
317. Ahn Y, Sabouny R, Villa BR, Yee NC, Mychasiuk R, Uddin GM, et al. Aberrant Mitochondrial Morphology and Function in the BTBR Mouse Model of Autism Is Improved by Two Weeks of Ketogenic Diet. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
318. Tang G, Gutierrez Rios P, Kuo SH, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiol Dis.* 2013;54:349-61.
319. Sitarz KS, Elliott HR, Karaman BS, Relton C, Chinnery PF, Horvath R. Valproic acid triggers increased mitochondrial biogenesis in POLG-deficient fibroblasts. *Mol Genet Metab.* 2014;112(1):57-63.
320. Carrasco M, Salazar C, Tiznado W, Ruiz LM. Alterations of Mitochondrial Biology in the Oral Mucosa of Chilean Children with Autism Spectrum Disorder (ASD). *Cells.* 2019;8(4).
321. Oyarzabal A, Bravo-Alonso I, Sánchez-Aragó M, Rejas MT, Merinero B, García-Cazorla A, et al. Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive dietary response in this form of autism. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):592-600.
322. Wong PW, Garcia EF, Pessah IN. ortho-substituted PCB95 alters intracellular calcium signaling and causes cellular acidification in PC12 cells by an immunophilin-dependent mechanism. *J Neurochem.* 2001;76(2):450-63.
323. Sherer TB, Richardson JR, Testa CM, Seo BB, Panov AV, Yagi T, et al. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2007;100(6):1469-79.
324. Shenker BJ, Guo TL, O I, Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;157(1):23-35.
325. Fowler BA, Woods JS. Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria during chronic oral methyl mercury exposure: the relationship to renal function. *Exp Mol Pathol.* 1977;27(3):403-12.
326. Rossignol DA, Frye RE. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Mol Psychiatry.* 2012;17(4):389-401.
327. Rose S, Melnyk S, Trusty TA, Pavliv O, Seidel L, Li J, et al. Intracellular and extracellular redox status and free radical generation in primary immune cells from children with autism. *Autism Res Treat.* 2012;2012:986519.
328. James SJ, Rose S, Melnyk S, Jernigan S, Blossom S, Pavliv O, et al. Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. *Faseb j.* 2009;23(8):2374-83.
329. Rose S, Melnyk S, Pavliv O, Bai S, Nick TG, Frye RE, et al. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Transl Psychiatry.* 2012;2(7):e134.
330. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141b(8):947-56.
331. Giulivi C, Zhang YF, Omanska-Klusek A, Ross-Inta C, Wong S, Hertz-Picciotto I, et al. Mitochondrial dysfunction in autism. *Jama.* 2010;304(21):2389-96.
332. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun.* 2011;25(5):840-9.
333. Stubbs EG, Crawford ML. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr.* 1977;7(1):49-55.

334. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun.* 2012;26(3):383-92.
335. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2010;24(1):64-71.
336. Jyonouchi H, Sun S, Le H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol.* 2001;120(1-2):170-9.
337. Li H, Ham A, Ma TC, Kuo SH, Kanter E, Kim D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. *Autophagy.* 2019;15(1):113-30.
338. Villavicencio-Tejo F, Olesen MA, Aránguiz A, Quintanilla RA. Activation of the Nrf2 Pathway Prevents Mitochondrial Dysfunction Induced by Caspase-3 Cleaved Tau: Implications for Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(3).
339. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z, et al. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;2(5):361-70.
340. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem.* 2018;552:50-9.
341. Vyssokikh MY, Holtze S, Averina OA, Lyamzaev KG, Panteleeva AA, Marey MV, et al. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(12):6491-501.
342. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:105135.
343. Tirichen H, Yaigoub H, Xu W, Wu C, Li R, Li Y. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Front Physiol.* 2021;12:627837.
344. Kausar S, Wang F, Cui H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells.* 2018;7(12).
345. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* 2014;2:206-10.
346. Shen L, Feng C, Zhang K, Chen Y, Gao Y, Ke J, et al. Proteomics Study of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) in Autistic Children. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:105.
347. Jyonouchi H, Geng L, Rose S, Bennuri SC, Frye RE. Variations in Mitochondrial Respiration Differ in IL-1 β /IL-10 Ratio Based Subgroups in Autism Spectrum Disorders. *Front Psychiatry.* 2019;10:71.
348. Frye RE, Cakir J, Rose S, Palmer RF, Austin C, Curtin P, et al. Mitochondria May Mediate Prenatal Environmental Influences in Autism Spectrum Disorder. *J Pers Med.* 2021;11(3).
349. Waizbard-Bartov E, Ferrer E, Young GS, Heath B, Rogers S, Wu Nordahl C, et al. Trajectories of Autism Symptom Severity Change During Early Childhood. *J Autism Dev Disord.* 2021;51(1):227-42.

8 EKLER

8.1 EK 1: Hayvan deneyleri yerel etik kurul izni



9 ÖZGEÇMİŞ



Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları

1. Kolgazi, M., Cilingir, S., Yilmaz, O., Gemici, M., Yazar, H., Ozer, S., Acikel-Elmas, M., Arbak, S., & Suyen, G. G. (2021). Caffeic acid attenuates gastric mucosal damage induced by ethanol in rats via nitric oxide modulation. *Chemico-biological interactions*, 334, 109351. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109351>
2. Taştan, C., Kançağı, D. D., Turan, R. D., Yurtsever, B., Çakırsoy, D., Abanuz, S., Yılanıcı, M., Seyis, U., Özer, S., Mert, S., Kayhan, C. K., Tokat, F., Açikel Elmas, M., Birdoğan, S., Arbak, S., Yalçın, K., Sezgin, A., Kızılkılıç, E., Hemşinlioğlu, C., İnce, Ü., ... Ovalı, E. (2020). Preclinical Assessment of Efficacy and Safety Analysis of CAR-T Cells (ISIKOK-19) Targeting CD19-Expressing B-Cells for the First Turkish Academic Clinical Trial with Relapsed/Refractory ALL and NHL Patients. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, 37(4), 234–247. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2020.2020.0070>
3. Sir Karakus, G., Tastan, C., Dilek Kancagi, D., Yurtsever, B., Tumentemur, G., Demir, S., Turan, R. D., Abanuz, S., Cakirsoy, D., Seyis, U., Ozer, S., Elibol, O., Elek, M., Ertop, G., Arbak, S., Acikel Elmas, M., Hemsinlioglu, C., Kocagoz, A. S., Hatirnaz Ng, O., Akyoney, S., ... Ovali, E. (2021). Preclinical efficacy and safety analysis of gamma-irradiated inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Scientific reports*, 11(1), 5804. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83930-6>
4. Turan, R. D., Tastan, C., Dilek Kancagi, D., Yurtsever, B., Sir Karakus, G., Ozer, S., Abanuz, S., Cakirsoy, D., Tumentemur, G., Demir, S., Seyis, U., Kuzay, R., Elek, M., Kocaoglu, M. E., Ertop, G., Arbak, S., Acikel Elmas, M., Hemsinlioglu, C., Hatirnaz Ng, O., Akyoney, S., ... Ovali, E. (2021). Gamma-irradiated SARS-CoV-2 vaccine candidate, OZG-38.61.3, confers protection from SARS-CoV-2 challenge in human ACEII-transgenic mice. *Scientific reports*, 11(1), 15799. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95086-4>

Sözlü Bildiriler:

1. Ozer, S., Filiz, E. S., Sapci, I., Albayrak, E., Acar, D., & Suyen, G. G. (2019, December). The Effect of Hippocampal Replay-Induced During Wakefulness on Learning and Memory in Rats. In *ACTA PHYSIOLOGICA* (Vol. 227, pp. 40-40). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
2. Cilingir, S., Bayburt, S., Genc, D., Ozer, S., & Suyen, G. G. (2019, December). Effects of Centrally-Injected Neuropeptide S on Epileptic Seizures, Anxiety and Learning and Memory; Role of Gender. In *ACTA PHYSIOLOGICA* (Vol. 227, pp. 80-80). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.

