

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ

**FARELERDE VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN  
OTİZM MODELİNDE SEFTRIAKSONUN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gamze GÜR**

**Referans no: 10126026**

EDİRNE –2019

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ

**FARELERDE VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN  
OTİZM MODELİNDE SEFTRİAKSONUN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gamze GÜR**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP-2017/190**

**Tez no:**

EDİRNE –2019

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Dr. Öğretim Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'un danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Gamze GÜR'e ait tez başlığı "Farelerde Valproik Asit ile Oluşturulan Otizm Modelinde Seftriaksonun Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18.04.2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.



**Dr. Öğretim Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ**  
**JÜRİ BAŞKANI**



**Prof. Dr. Aydın BARLAS**  
**ÜYE**



**Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ**  
**ÜYE**

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

**Prof. Dr. Tammam SİPAHİ**  
**Enstitü Müdürü**



## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımnda değerli katkıları olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'a, ayrıca Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'a, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e ve bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Kübra DUVAN AYDEMİR'e, Araş. Gör. Dilşat BALCI'ya, daima yanımda olup beni destekleyen aileme ve desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU</b> .....	3
<b>TERATOJENLER İLE OLUŞTURULAN OTİZM MODELLERİ</b> .....	9
<b>OTİZM İLE GABA/GLUTAMAT İLİŞKİSİ</b> .....	11
<b>SEFTRİAKSON GLUTAMAT İLİŞKİSİ</b> .....	12
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	13
<b>BULGULAR</b> .....	23
<b>TARTIŞMA</b> .....	49
<b>SONUÇLAR</b> .....	56
<b>ÖZET</b> .....	59
<b>SUMMARY</b> .....	60
<b>KAYNAKLAR</b> .....	61
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	69
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	71
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>EAAT</b>	: Eksitatör amino asit taşıyıcı
<b>GABA</b>	: Gaba amino bütirik asit
<b>GLT-1</b>	: Glutamat taşıyıcı-1
<b>i.p.</b>	: İntraperitoneal
<b>OSB</b>	: Otizm spektrum bozukluğu
<b>VPA</b>	: Valproik asit

## GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB); son zamanlarda oldukça sık duyulan, sosyal etkileşimde ve sözel/sözel olmayan iletişimde bozulma, ilgi ve etkinliklerde sınırlılık ve yineleyici davranışlarla karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Bu belirtilerin yanı sıra, yoğun odaklanma, günlük aktivitelere aşırı bağlılık, çevrede veya günlük düzende/aktivitelere meydana gelen değişikliklere karşı direnç, kendine veya çevresine zarar vermeye eğilimli olma, duyuşal uyarılara karşı olağandışı tepkiler verme gibi davranışsal problemler de görölmektedir. Tıbbi ve sosyal platformlarda OSB ile ilgili farkındalığın giderek artması olumlu bir gelişme olmasına rağmen, henüz istenen düzeye ulaşmamıştır. Nöropsikiyatrik bozukluklar arasında sık görölmeye rağmen, OSB'nin nedeni henüz aydınlatılamamıştır, tedavisi de henüz net değildir. OSB olan kişiler için en etkili yöntem, erken tanı konulabilmesi ve ardından özel yoğun eğitimidir. OSB'de karşılaşılan davranış bozukluklarının giderilmesi ve hastanın zihinsel işlevlerini desteklemek amacıyla günümüze kadar birçok ilaç denenmiş ve ilaçların çoğu, sınırlı derecede faydalı olmuştur (1).

Valproik asit (VPA) nedenli otizm benzeri semptomların mekanizmaları henüz netlik kazanmamasına rağmen, prelinik çalışmalar, VPA'nın epigenetik etkilere sahip olduğu ve asıl etkisini merkezi sinir sistemi üzerinde gösterdiği yönündedir. Birçok nöbet tipinde antikonvülzan etki göstermektedir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, valproatın antikonvülzan etkiyi iki şekilde yaptığını ortaya koymuştur. Valproatın doğrudan oluşturduğu etkiler yanında, aktif metabolitleri aracılığıyla oluşturduğu etkiler de var (2).

Beyinde bulunan en önemli inhibitör nörotransmitter olan gaba aminobütirik asit'in (GABA) ekstraselüler konsantrasyonunu kontrol eden GABAerjik ileti sistemlerinde meydana gelen bozuklukların, otizm hastalarında görülen davranış bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir (3,4).

Beyindeki en önemli eksitator aminoasit nörotransmitter olan glutamatın ekstrasellüler konsantrasyonu ise, glutamat transporter sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu transporter sisteminin en önemli üyesi ise glutamat uptake'inin %90'ını sağlayan glutamat taşıyıcı-1'dir (GLT-1). OSB olan bireylerde GABA seviyesi ile, GABA/glutamat oranlarının normal bireylere göre oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte son dönemlerde, beta laktam antibiyotiklerden olan seftriaksonun glutamat uptake'ini artırdığı yönünde birçok çalışma bulunmaktadır (5,6).

Farelerde santral sinir sistemi gelişimin olduğu embriyonik 7,5.-18,5. günler arasında olmaktadır (7). Bu periyod içinde farklı dozlarda VPA'ya maruz kalan farelerde otizm benzeri davranışlar görüldüğü bildirilmektedir. Özellikle intrauterin 12,5. günde 600 mg/kg tek doz VPA enjeksiyonu yapılan annelerden doğan erkek yavrular otistik kabul edilmekte ve deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır (8).

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmamızda, intrauterin dönemde 12,5. günde VPA'ya maruz kalan gebe farelerden doğan erkek farelerde uygulanan seftriaksonun beyindeki GLT-1 ekspresyonunu artırarak sinaptik aralıktaki glutamat miktarını azaltmayı ve bu azalmanın OSB'deki davranışsal testlere etkisini araştırmayı amaçladık.



## **GENEL BİLGİLER**

### **OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU**

#### **Tanım**

Otizm terimi ilk olarak Amerikalı çocuk psikiyatristi Leo Kanner tarafından kullanılmıştır. Leo Kanner otizmi, yaşam boyu devam eden, sosyalleşme, iletişim gibi birçok faktörü etkileyen bir sendrom şeklinde tanımlamıştır (9).

Otizm spektrum bozukluğu, iletişim becerilerindeki eksiklikler, kısıtlı ve tekrarlayıcı davranışlarla karakterize, yaygın ve ciddi bir nörogelişimsel hastalıktır (10).

Otizm, bir spektrum bozukluğu olmakla birlikte, bireylerde ortaya çıkan semptomların şiddeti ve şekli değişkenlik gösterebilmektedir. Otizm genellikle yaşamın ilk iki yılında ortaya çıkmakta, ancak 'gelişimsel bozukluk' olması sebebiyle her yaşta teşhis edilebilmektedir. Otistik bireylerin, diğer bireylerle iletişimde ve etkileşimde zorluk yaşadığı, kısıtlanmış ilgi alanları ve tekrarlanan davranışlar gösterdiği, uyarılara karşı fazla duyarlılık veya duyarsızlık gösterdiği, okul iş ve diğer yaşam alanlarında işlev görme yeteneklerinin bozulduğu görülmektedir (11).

#### **Otizimde Risk Faktörleri**

Otizm spektrum bozukluğunun görülme sıklığı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, Otizm ve Gelişimsel Engelliler İzleme Ağından (ADDM) elde edilen tahminlere göre her 59 çocuktan yaklaşık olarak birinde OSB görülmektedir. OSB'nin tüm ırksal, etnik ve sosyoekonomik gruplarda meydana geldiği

bildirilmektedir (12). Otizmin dünya genelinde nüfus prevalansı yaklaşık %1 olmakla beraber, erkek bireyleri kadın bireylerden daha fazla etkilemektedir (13).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, ADDM verileri ise otizm spektrum bozukluğunun erkek çocuklarda görülme sıklığının kız çocuklara oranının 5 kat fazla olduğunu bildirmiştir (14).

Otizmin görülme sıklığı toplumda günden güne artmaktadır. Ülkemizde bu hastalığın görülme sıklığı üzerine yapılmış bir çalışma henüz yoktur. Ancak Türkiye’de çok az sayıda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde ülkemizde de otizmin erkek/kız oranının yaklaşık olarak 5/1 şeklinde olduğu görülmüştür (15).

Otizm teşhisi konulan çocuklar da entelektüel yeteneğin dağılımı cinsiyet ve ırk / etnik kökene göre değişmekte iken bu çocukların neredeyse yarısı (%44) ortalama veya ortalamanın üzerinde entellektüel kabiliyete sahiptir (12).

Genetik faktörlerin yanında çevresel faktörler de otizm için risk teşkil etmektedir. Örneğin, yaşça daha büyük ebeveynlerden doğan çocukların otistik olma ihtimali daha yüksektir. Bununla beraber, çoklu doğum, düşük doğum ağırlığı veya hamilelikte anne enfeksiyonları da doğan çocuklarda otizm riskini yükseltmektedir (16).

Tüm bunların yanında otizm spektrum bozukluğunun, Frajil X sendromu veya tüberoskleroz gibi belirli genetik veya kromozomal rahatsızlıkları olan kişilerde daha sık görüldüğü ve hamilelik sırasında annenin valproik asit veya talidomid kullanımının da yüksek OSB riski ile bağlantılı olduğu görülmektedir (15).

### **Otizm Etiyolojisi**

Otizm spektrum bozukluğunun genlerin ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile geliştiği düşünülse de etiyojisi hala belirsizdir (17). Ancak etiyojisi belirlemek üzerine son dönemde yapılan araştırmalarda, beyin işlevleri, genetik, immünolojik ve nörokimyasal etmenlerin başrol oynadığı belirlenmiştir (18,19).

Otizm ile birebir ilişkili genlerin tam olarak açıklanamaması, hastalığın erkeklerde daha sık görülmesi, ailelerin çocukları arasında tekrarlama ihtimalini yüksek olması otizmin çok faktörlü bir hastalık olduğunu düşündürmektedir (20-22).

## **Otizm Tanısı**

Etiyolojisi heterojen faktörlerin karışımı olan otizmin tanısı için herhangi bir test şu anda mevcut değildir. Klinisyenler tanı için davranışsal bozuklukların kanıtlarına inanmaktadırlar (10).

Araştırmalar, 2 yaşına kadar konulan otizm tanısının güvenilir, geçerli ve stabil olabileceğini göstermiştir (23,24).

Çalışmalar, OSB'li çocukların ebeveynlerinin, çocuğun ilk yaş gününden önce gelişimsel bir sorun olduğunu fark ettiklerini göstermiş, görme ve duyma ile ilgili endişeler ilk yıl içinde daha sık bildirilmiştir. Ayrıca sosyal, iletişim ve ince motor becerilerdeki farklılıklar 6 aylıktan itibaren belirgin hale gelmiştir (25).

Dolayısıyla, otizmi tanımlamak için özellikle sosyal etkileşim ve iletişim eksikliğinin azlığı ile tekrarlayıcı ve kısıtlı davranış modelleri, aktiviteler ve ilgi alanlarının varlığı dikkat çekmektedir (1,10,26).

*Günümüzde otistik bozukluğun tanısı ICD-10 ve/veya DSM-IV-TR tanı ölçütlerine göre konulmaktadır.*

*Bu ölçütler DSM IV'e göre şunlardır;*

*A. En az ikisi (1). maddeden ve birer tanesi (2). ve (3). maddelerden olmak üzere (1), (2) ve (3). maddelerden toplam altı (ya da daha fazla) maddenin bulunması:*

*(1) Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren toplumsal etkileşimde nitel bozulma:*

*(a) Toplumsal etkileşim sağlamak için yapılan el-kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi birçok sözel olamayan davranışta belirgin bir bozulmanın olması,*

*(b) Yaşlarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememeye,*

*(c) Diğer insanlarla eğlenme, ilgilerini ya da başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örneğin ilgilendiği nesnelere göstermeme, getirmeme ya da belirtmeme),*

*(d) Toplumsal ya da duygusal karşılıklar vermeme.*

*(2) Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren iletişimde nitel bozulma:*

*(a) Konuşulan dilin gelişiminde gecikme olması ya da hiç gelişmemiş olması (el, kol ya da yüz hareketleri gibi diğer iletişim yollarıyla bunun yerini tutma girişimi eşlik etmemektedir),*

(b) Konuşması yeterli olan kişilerde, başkalarıyla söyleşiyi başlatma ya da sürdürmede belirgin bir bozukluğun olması,

(c) Basmakalıp ya da yineleyici ya da özel bir dil kullanma,

(d) Gelişim düzeyine uygun çeşitli, imgesel ya da toplumsal taklitlere dayalı oyunları kendiliğinden oynamama,

(3) Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, basmakalıp ve yineleyici örüntülerin olması:

(a) İlgilenme düzeyi ya da üzerinde odaklanma açısından olağandışı, bir ya da birden fazla basmakalıp ve sınırlı ilgi örüntüsü çerçevesinde kapanıp kalma,

(b) Özgül, işlevsel olmayan, alışlageldiği üzere yapılan gündelik işlere ya da törensel davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma,

(c) Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örneğin parmak şaklatma, el çırpma ya da burma ya da karmaşık tüm vücut hareketleri),

(d) Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma.

B. Aşağıdaki alanlardan en az birinde, 3 yaşından önce gecikmelerin ya da olağandışı bir işlevselliğin olması

(1) Toplumsal etkileşim,

(2) Toplumsal iletişimde kullanılan dil

(3) Sembolik ya da imgesel oyun.

C. Bu bozukluk Rett Bozukluğu ya da Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğuyla daha iyi açıklanamaz (27).

### **Otizimde Tipik Belirtiler**

Otizm; yaşamın ilk 3 yılında ortaya çıkan, ömür boyu devam eden dil, sosyalleşme ve iletişimi olumsuz etkileyen bir bozukluktur. Yaşamın erken döneminde gelişimleri ve iletişimleri normal olan çocuklarda; 12 ve 15. aylar arasında sözlü iletişim, mimik ve jestlerde duraklama başlar. Yürüme çağına giren çocuklarda, ebeveynlerinin ellerini tutmak istememe, acıktıklarını sözel veya işaretlerle ifade edememe görülmektedir. Bu çocukların sese ve temasa duyarlılıkları fazla iken, basit kelimeleri anlamadıkları, içine kapanık, dil gelişimi duraksamış, amaçsız ve katı hal sergilemeye başlarlar (28,29).

Klinik belirtiler bireylerde en hafiften en ağıra kadar farklı şiddetlerde görülebilmektedir. Otizm gelişimsel bir sendrom olmasından dolayıdır ki, otistik bireyleri

tanımlamak için birçok özellik bulunmaktadır, ancak bu özelliklerin tümü her bireyde bulunmamakta ya da aynı anda görülmemektedir (28,30).

Otistik bireyler genellikle tehlikeyi farketmezler. Normal bireylere oranla çok hareketli veya hareketsizdirler. Tekrarlayıcı yineleyici davranışlar sergilerler, ihtiyaçlarını ifade edemez ve çoğu zaman stresli olurlar. Sevilirken temas edilmesinden hoşlanmayabilirler. Özel eğitim yöntemleri otizm hastaları için, standart eğitime oranla daha etkilidir (31).

### **Otizm Nedenleri**

Otizm, intrauterin dönemde maruz kalınan toksik maddeler ve çeşitli patojenlerle ilişkilendirilmiştir (32). Annenin prenatal dönemde viral etkenlere maruz kalması da otizm için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (33).

Gebelik boyunca fetüsü etkileyecek olan hastalıklar (gestasyonel diyabet), maternal enfeksiyonlar (kızamıkçık, sitomegalovirüs vb.) ve maternal inflamasyonun yanı sıra valproik asit, talidomid, misoprostol gibi ilaçlar, ağır metaller, etanol ve sigara kullanımının otizm ile ilişkili olabileceği yönünde düşünceler mevcuttur (34,35).

Yapılan çalışmalar gebelikte teratojenlere maruziyetin, bebeğin beyin gelişimini etkileyerek otizme neden olabileceğini göstermiştir. Otistik çocukların kafa çevresi, beyin hacmi ve ağırlığı, otistik olmayan çocuklara göre oldukça fazladır (36).

1999 Yılında Aylward ve arkadaşları (37) otistik bireyler ile normal kişilerin manyetik rezonans görüntülerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, hipokampus ve amigdala hacimlerini beynin total hacmine oranladıklarında hem amigdala hem de hipokampal hacimlerinin azaldığını görmüşlerdir.

Otistik bireylerdeki görsel tarama ve tanıma becerilerindeki bozulmaya otistik bireylerin iletişim kurdukları kişilerin göz bölgesine değil de ağız bölgesine bakmalarının sebep olduğu düşünülmektedir. Otistik bireylerin beyinlerinde yüz işleme süreçlerini gerçekleştiren kortikal bölgede (fusiform girus) hareketliliğin çok az olduğunu görülmüştür (38,39). Ayrıca otistik bireylerde amigdalada hareketliliğin az olması bu bireylerin, iletişimlerinde bakış sabitleme sürelerinin azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir (39,40).

Sears ve arkadaşları (41) 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada, yapısal MRI (manyetik rezonans görüntüleme sistemi) kullanarak, otistik bireylerde, kompulsiyonlar ve tekrarlayıcı hareketler ile kaudat çekirdeğinin hacminin orantılı olarak artmış olduğunu gözlemlemiştir (36).

Kemper ve Bauman (42) otizmli bireylerde nöropatolojik incelemeyi ilk yapan kişilerdendir. Kemper ve Bauman, anterior singulat korteksin beklenen düşük hacimde olduğunu ve azalmış aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bailey ve arkadaşları (43) ise yaptıkları çalışmada otistik bireylerde hipokampus hücre yoğunluğunun daha fazla olduğunu, ancak morfometrik analizlerde normal bireylerden bir fark olmadığını görmüşlerdir. Ayrıca serebellum çekirdeklerinde Purkinje hücrelerinde kayıp olduğunu, ancak granül hücrelerinde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (36). Beynin bölümlerinden frontal lop, üst temporal korteks, parietal korteks ve amigdala'da otizm sebebiyle meydana gelen fonksiyon bozulmalarının, sosyal davranışları etkilediği, deneysel hayvan çalışmaları, insanlarda yapılan lezyon çalışmaları ve beyin görüntüleme çalışmalarıyla gösterilmiştir (44). Otistik bireylerde doğum sonrası 12. aydan itibaren, beyin çabuk gelişip büyüdüğü (toplam beyin hacminde %5-10 arası artış vardır), ancak ilerleyen dönemlerde beyin yaşla orantılı olarak büyümeye devam etmesi gerekirken, bu büyümenin zamanla yavaşladığı görülmektedir. Fazla sayıda otistik bireylerin yer aldığı bir çalışmada ise otistik bireylerin serebellumunun daha büyük olduğu gözlemlenmiştir (44,45).

Otizm genetik temeli ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Otizmle ilişkili olduğu bilinen genlerden bazıları *NRXN1*, *SCN7A*, *GAT1*, *OXTR*, *CNTN3*, *SLC9A9*, *DIA1*, *FOXP2*, *WNT2*, *RELN*, *HOXA1*, *HOXB1*, *MET*, *EN2*, *HRAS*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, *UBE3A*, *ATP10C*, *5-HTT*, *SHANK3*, *MeCP2*, *NLGN3*, *NLGN4*, *SLC9A6*, *FMR1* şeklinde belirtilmiştir (18).

### **Otizimde Tedavi**

Otizm spektrum bozukluğunu ve temel semptomlarını tamamen ortadan kaldıracak bir tedavi günümüzde bulunmamaktadır. Ancak yaşamlarını kolaylaştırmak üzere yardımcı tedavi yöntemleri mevcuttur.

Bunlardan bazıları; işitsel eğitim, ayırık deneme eğitimi, vitamin terapisi, iletişimi kolaylaştırma, müzik terapisi, mesleki terapi, fizik tedavi ve duyuşal entegrasyondur.

Farklı tedavi tipleri genellikle aşağıdaki kategorilere ayrılabilir:

- Davranış ve İletişim Yaklaşımları
- Diyet Yaklaşımları
- İlaç
- Tamamlayıcı ve alternatif ilaç (46).

## **TERATOJENLER İLE OLUŞTURULAN OTİZM MODELLERİ**

Otizmin etiolojisi henüz gizemini korusa da genetik faktörler dışında çevresel faktörlerden olan, prenatal dönemde teratojenlere maruziyetin de otizme neden olabileceğinden bahsetmiştik. Otizm üzerine çalışma yapılmasını sağlamak amacıyla, hayvan modeli olarak otizm oluşturmak üzere teratojenler tercih edilmektedir.

Hayvanlarda otizm benzeri davranışlar ortaya çıkarmak için, gebe kemirgenler VPA, talidomid ve etanole maruz bırakılmaktadırlar (35,47).

### **Etanol ile Oluşturulan Otizm Modeli**

Fetal alkol sendromu (FAS) ilk olarak 1973'te tanımlanmıştır. Bu tarihten sonra alkolün teratojenik etkilerini ortaya çıkarmak üzere birçok çalışma yayınlanmıştır. Özellikle, alkolün çocuklarda beyin, kraniofasiyal ve ekstremitelerde anormalliklerine neden olan bir teratojen olduğu yaygın bir şekilde belgelenmiştir (48). Etanol'ün teratojenik etkisini dorsal ve median rafe nükleuslarda serotonerjik nöronların hem sayısını azaltmak hem de migrasyonlarını bozmak suretiyle ortaya çıkardığı düşünülmektedir (35). Prenatal dönemde alkole maruz kalan hayvanlarda sosyal iletişim, sosyal etkileşim ve cinsel davranışların etkilendiği görülmüştür (49).

### **Talidomid ile Oluşturulan Otizm Modeli**

Talidomid ilk olarak sedatif etkisi için geliştirilmiş olmasına rağmen, uzuv gelişimini olumsuz etkilemesi üzerine teratojen kabul edilmiştir. Günümüzde multipl miyelom için immünomodülatör olarak yaygın reçetelenmektedir, ancak geri dönüşümlü şekilde hafıza kaybı yan etkisi bulunmaktadır. Talidomid insan kromozomunda, mutasyon geçirdiğinde zihinsel bozukluğa neden olan *Sereblon (Crbn)* geni üzerinde etki gösterir. Talidomid enjeksiyonu yapılan farelere davranış testleri uygulandığında otistik bireylere benzer davranışlar (anormal bilişsel davranışlar) sergiledikleri gözlemlenmiştir (50).

### **Valproik Asit ile Oluşturulan Otizm Modeli**

Günümüzde epilepside çocuklarda ve yetişkinlerde yaygın olarak kullanılan antiepileptik ilaçlardan biri olan valproik asit (diğer adıyla 2-propilpentanoik asit) kısa zincirli bir yağ asididir (51).  $C_8H_{12}O_6$  şeklinde kimyasal olarak formüle edilmiştir.

İlk olarak 1980'li yılların başında çeşitli konjenital malformasyonlara sebep olmasıyla, VPA'nın teratojenik olduğuna dair ilk endişe ortaya çıkmıştır. Bu malformasyonlar fetal valproat sendromu (FVS) olarak gruplandırılmıştır. Bunun ardından, 1994 yılında, uterin maruziyet sonrası ortaya çıkan gelişimsel bozulma listesine artan otizm riski de eklenmiştir. (52).

Rodier ve arkadaşları (53) 1996 yılında sıçan embriyolarına tek doz 350 mg/kg VPA uygulayarak otizm modelini geliştirmişlerdir. Bu tarihten itibaren, kemirgenlerin prenatal dönemde VPA'ya maruz bırakılması otizm modeli olarak kullanılmaya başlanmıştır (10).

Schneider ve Przewlocki (54) VPA nedenli otizm hayvan modelinde hayvanların davranışlarını, davranış testleri ile ayrıntılı inceleyip değerlendiren ilk araştırmacılarıdır. VPA'ya maruz kalan erkek sıçanların otistik hastalara benzeyen davranışlar sergilediklerini, sosyal davranışlarının azaldığını, tekrarlayıcı hareketler yaptıklarını, ağrıya daha düşük hassasiyet gösterdiklerini gözlemlemişlerdir (10).

VPA'ya gebelikte maruz kalan insanlarda ve kemirgenlerde otistik benzeri davranışlara sebep olan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (10). Ancak folik asit metabolizmasında bozulmanın, histon deasetilasyonunda inhibisyonun ve artan oksidatif stresin rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır (1).

Yapılan başka bir klinik çalışmada gebelik sırasında VPA alımının spina bifida asperta, gelişimsel gecikme, kognitif bozukluklar ve otizm gibi birçok riske yol açtığı bildirilmiştir (10).

Danimarka'da geniş bir popülasyonda yapılan araştırmada, gebe annenin VPA kullanımının, doğacak çocukların otistik olma riskini %4,42 artırdığını göstermiştir. 11 yıllık prospektif başka bir çalışmada ise, prenatal dönemde tek doz VPA'ya maruz kalan çocuklarda, nörogelişimsel bozuklukların prevalansında 6 kat, birden fazla doz VPA'ya maruz kalan çocuklarda ise 10 kat artış olduğu bildirilmiştir (10).

VPA'ya maruz kalan sıçanların ve farelerin sosyal davranışlarında meydana gelen azalma, kemirgenlerde sosyalliğin değerlendirilmesi için sıkça kullanılan standart üç odalı sosyal yaklaşım testi kullanılarak da gösterilmiştir (10).

VPA'nın sıçanlardaki sosyallik üzerine olumsuz etkileri olduğunu destekler bir çalışma da Markam ve arkadaşları (55) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada VPA'ya maruz bırakılan sıçanların oyun davranışlarını azalttığı, aktif etkileşimlerden kaçındığı gösterilmiştir (10).



Otizm oluşturmak üzere yaygın kullanılan bu modelde, VPA maruziyetinin zamanı da önemlidir. Farelere 9. ve 14,5. günde VPA verilmesi ile 12,5. günde VPA verilmesi arasında, otistik davranışlarda belirgin farklılıklar olduğu görülmüştür (8).

Kısacası; prenatal dönemde VPA verilen kemirgenlerin, otistik hastalarda gözlemlenen davranışsal bozukluklara eşdeğer davranışlar sergiledikleri birçok çalışmada daha görülmüştür. Bu nedenle insanlarda otistik davranışların altında yatan nörobiyolojiyi tanımlamak ve otizm tedavisi için yeni ilaçları belirlemek adına, kemirgenlere VPA uygulanması, yaygın kullanılan bir model halini almıştır (10).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan ve belirli standartlara bağlanmış VPA kaynaklı otizm modelinde, prenatal dönemde fare ya da sıçanlara, gebeliğinin 12,5-13. gününde 600 mg/kg dozda VPA enjeksiyonu yapılmaktadır. Doğan fare ya da sıçan yavrularının (özellikle erkek yavrular) otizmle eşdeğer davranışlar gösterdiği birçok çalışma ile desteklenmiştir.

### **OTİZM İLE GABA/GLUTAMAT İLİŞKİSİ**

Otizm spektrum bozukluğunun etiyolojisi ve patogenezi henüz netlik kazanmamıştır. Ancak yapılan birçok çalışmada otistik bireylerde GABA, glutamat gibi birçok nörotransmitterde anormalliğin söz konusu olduğu görülmüştür. Santral sinir sisteminde uyarıcı (eksitator) nörotransmitter olan glutamat ve inhibitör etkili GABA oranlarında dengesizlik, otizm spektrum bozukluğunun OSB patogenezi ile yakın ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca otizm spektrum bozukluğu üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile hayvan modeli çalışmaları GABA sinyal yolunun, otizm patogenezinde önemli rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (56).

GABA, santral sinir sistemindeki ana inhibitör nörotransmitter olup, doğum sonrası yaşamın erken döneminde depolarize edici ve eksitator bir etki gösterir. GABA depolarize edici etkisini, voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve/veya N-metil-D-aspartat reseptörleri aracılığıyla, hücre içinde kalsiyum artışına yol açarak göstermektedir. GABA aracılı kalsiyum sinyalleri hücre çoğalması, farklılaşması ve sinaps olgunlaşması gibi çeşitli gelişim süreçlerini düzenler. GABA'erjik sinyallerde meydana gelen değişiklikler ve eksitator/inhibitör dengesinin bozulması ile otizm gibi bazı nörogelişimsel bozuklukların meydana geldiği düşünülmektedir (57).

Yine başka bir çalışmada otistik fare modellerinde GABAerjik sinyalde bozukluk olduğu görülmüştür (58).

Otizimli bireylerde normal bireylere oranla plazmada GABA miktarı yüksek ve glutamat/GABA oranı düşük seyretmektedir (59). Ancak bunun aksini raporlayan çalışmalar da bulunmaktadır (6).

Santral sinir sistemindeki en önemli eksitatör amino asit nörotransmitter glutamattır. Glutamat transporter sistemi, ekstraselüler glutamat hemostazını kontrol etmektedir. EAAT1 (eksitatör amino asit taşıyıcı 1, GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3, EAAT4 ve EAAT5 olmak üzere günümüzde 5 çeşit eksitatör amino asit taşıyıcısı belirlenmiştir (60).

Glutamat konsantrasyonunun düzenlenmesinde kilit rol oynayan ve merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan glutamat taşıyıcısı EAAT2'dir (GLT-1) (61).

Glutamat taşıyıcıları, nöronları glutamat nörotoksitesinden koruma konusunda önemli role sahip olmakla birlikte nörotoksiteyi de önlemektedirler. Bunlardan GLT-1, glutamatın sinaptik görevinin sonlandırılmasında işlev görürken, glutamat uptake'inin %90'ını da sağlamaktadır (56).

Uyarıcı amino asit taşıyıcılarının (GLT-1) fonksiyonlarında meydana gelen bozukluklar, beyinde ekstraselüler glutamat seviyelerinin artmasına ve dolayısıyla otizm ve şizofreni gibi nörodejeneratif bozukluklara sebep olmaktadır (62).

### **SEFTRIAKSON-GLUTAMAT İLİŞKİSİ**

Son dönemde yapılan çalışmalar, beta laktam antibiyotiklerin glutamat uptake'ini artırdığı yönündedir (63). Özellikle seftriaksonun GLT-1 ekspresyonunu ve gen transkripsiyonunu artırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur (64). Yapılan hayvan çalışmalarında, seftriaksonun GLT-1'in biyokimyasal ve fonksiyonel aktivitesini yükselttiği bildirilmiştir. Seftriakson, glutamat uptake'ini artırma işlevini, GLT-1'i aktive etmek suretiyle yapmaktadır (63).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış ve Ağrı Laboratuvarlarında Hayvan Etiği Evrensel İlkeleri ve İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyle Yel Etik Kurulu'nca 28/04/2017 tarih ve 2017/04 sayılı oturumda 2017/04/05 karar numarası ile onaylandı (Ek-1) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TÜBAP-2017/190 kayıt numarası ile desteklendi.

### **DENEKLER**

Bu araştırmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminde üretilen, 20-30 gram ağırlığında Balb/c türü dişi ve erkek farelerin çiftleştirilmesi sonucu gebe kalan ve gebeliği döneminde gruplarına uygun olarak salin ya da VPA'ya maruz kalan annelerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı. Toplamda 96 adet Balb/c türü erkek fare, her grupta 8 adet olmak üzere, 12 gruba ayrıldı. Deneklerin hepsi havalandırma ve ısıtma sistemleri otomatik olarak ayarlanan standart laboratuvar koşullarında ( $21\pm 1$  °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) barındırıldılar. Farelerin beslenmesinde standart fare yemi ve musluk suyu kullanılmakla birlikte, yem ve su miktarında herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

### **DENEY PLANI, KULLANILAN İLAÇLAR VE GRUPLAR**

Çalışmamız pozitif kontrol grupları (G12,5. günde anneleri intraperitoneal yolla 10 ml/kg salin uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler) ile negatif kontrol gruplarından

(G12,5. günde anneleri intraperitoneal yolla 600 mg/kg VPA uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler) oluşmaktadır.

Çalışmamızda otizm modeli oluşturmak için VPA kullanıldı. VPA uygulama günü ve dozu çeşitli çalışmalarda farklılık göstermesine karşın, çalışmamızda, daha sık kullanılan 600 mg/kg dozu tercih edildi (8). Salin içinde çözülen VPA (Sigma), farelere 10 ml/kg hacminde uygulandı. Otizmdeki rolünü araştırmak amacıyla kullandığımız seftriakson dozları 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg olarak belirlendi. Kontrol gruplarına salin 10 ml/kg hacminde uygulandı. Bütün enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) yoldan yapıldı.

Çalışmamızda kullanılacak farelerin ilk olarak ağırlıkları tartılarak not edildi, her bir farenin kuyrukları çalışmada belirlenen numaralandırma sistemine uygun olacak şekilde toksik olmayan boyalar ile boyandı. Fareler, her bir kafeste 8 adet fare olacak şekilde barındırıldı.

Çalışmadaki gruplar ve yapılan uygulamalar Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1. Çalışma grupları ve uygulanan enjeksiyonlar**

Gruplar	Hayvan Sayısı	Uygulama	
		G12,5	P47-57
Grup 1	8	Salin	-
Grup 2	8	VPA	-
Grup 3	8	VPA	Seftriakson 50 mg/kg
Grup 4	8	Salin	Seftriakson 50 mg/kg
Grup 5	8	VPA	Seftriakson 100 mg/kg
Grup 6	8	Salin	Seftriakson 100 mg/kg
Grup 7	8	VPA	Seftriakson 200 mg/kg
Grup 8	8	Salin	Seftriakson 200 mg/kg
Grup 9	8	VPA	Salin
Grup 10	8	VPA	Dihidrokinik asit 10 mg/kg
Grup 11	8	VPA	Seftriakson 200 mg/kg + Dihidrokinik asit 10 mg/kg
Grup 12	8	Salin	Salin

**VPA:** Valproik asit.

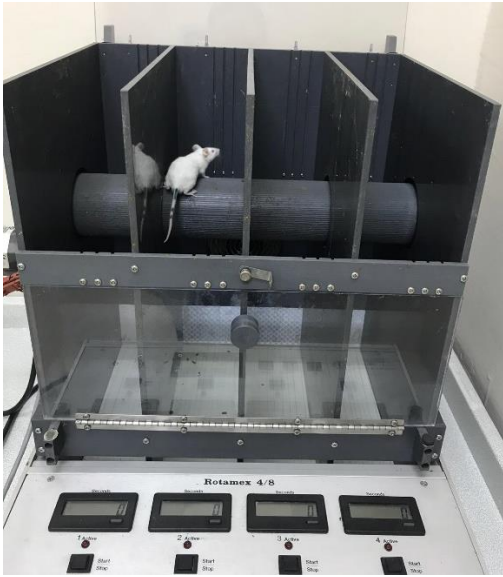
Tüm gruplarda yer alan yavru fareler 54 günlük olduklarında sırasıyla, *rotarod*, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi (*three chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*elevated plus maze*), *hot plate* ve açık alan (*open field*) testleri uygulandı.

## FARELERE UYGULANAN DAVRANIŞ TESTLERİ

### Rotarod Testi

Rota rod testi deneklerin motor koordinasyon, denge ve performanslarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan bir testtir (65,66). Deney hayvanlarının belirli bir yükseklikte ve belirli bir hızda elektrik enerjisiyle dönen silindir (rod) üzerinde dengede kalarak yürüyebilmesi veya rod üzerinden aşağı düşmemesi rotarod cihazın çalışma prensibini oluşturmaktadır. Otizm modeli oluşturulan gruplar ile kontrol gruplarının değerlendirilmesinde deneklerin rod üzerinde 180 saniye kalması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda rotarod performans testi, Rotamex 4/8 (Columbus Instrument, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 1). Birbirinden tamamen ayrılmış 4 kabinden oluşan düzeneğin (kabin genişliği 10 cm, yüksekliği 45 cm ve derinliği 30 cm) ortasından yatay silindir (rod) geçmektedir. Denek, belirli bir hızda (16 rpm) dönen bu silindir üzerinden aşağı düşmemek için, silindirin döndüğü yönün tersi yönünde yürümeye çalışır. Deney öncesinde farelerin test ortamına alışması amacıyla dönen silindir üzerinde birkaç kez tekrar yapılmıştır. Cihazın her bir kabininin ön bölümünde deneklerin silindir üzerinde düşmeden durdukları süreyi kayıt alan numaratorler yer almaktadır. Cihazın kabinlerine yeni denek konulmadan önce, cihazın tabanı %10'luk etanol ile silindi ve kurutuldu. Her bir denek, 3 defa silindir üzerinde yürümeye tabi tutuldu ve düzenek üzerinde düşmeden kaldıkları en uzun süre, rotarod performans değeri olarak kaydedildi. Bu veriler ile deneklerin denge becerileri değerlendirildi.



Şekil 1. Rotarod cihazı

### **Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik (Three Chamber) Testi**

Otistik özellikler gösteren kemirgenlerin sosyal davranış özelliklerini incelemek amacıyla, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi kullanıldı (Şekil 2). Test, 3 odadan oluşan, odacıklar arasında farenin gezinmesine izin veren kapıların bulunduğu ve gerektiğinde odalar arası kapıların duvarlar ile kapatılabildiği bir düzenek içerisinde 2 ardışık günde gerçekleştirildi. Düzenek boş, sessiz ve floresanla aydınlatılan bir odada bir masa üzerine yerleştirildi. Düzeneğin üzerinde tavana sabitlenmiş kamera aracılığıyla bilgisayara aktarılan video görüntüleri kaydedildi. İlk gün, hayvan deney ortamına alışmasının sağlanması amacıyla düzenek içerisine bırakıldı, 30 dakika boyunca düzenek içerisinde serbestçe gezinmesine izin verildi, herhangi bir kayıt alınmadı. İkinci gün deneylere başlandı. Deneyin ilk 5 dakikasında fare, deney düzeneğinin ortasına kondu, sağ ve sol odacıkların kapıları kapalı halde iken, farenin ilk gün alıştığı ortamı hatırlaması sağlandı, herhangi bir kayıt alınmadı ve analize dahil edilmedi. Düzenekte sol odacığa kafes içerisinde, deneğin daha önce görmediği yabancı bir fare (aynı ırk ve yaşa sahip deney gruplarının dışında bir fare) yerleştirildi, denek hala ortadaki odacıkta iken tüm duvarların kaldırılması ile deneyin ikinci kısmına geçildi, 10 dakika kayıt alındı ve analize dahil edildi. Bu ilk 10 dakikalık kısımda deneğin, yabancı fare ile olan iletişimi ve gösterdiği sosyal davranış analiz edildi. Bu analizde, deneğin yabancı fare ile geçirdiği süre, kat ettiği mesafe ve yabancı fareye olan uzaklığı değerlendirildi. Hayvan, tekrar deney düzeneğindeki orta odacığa alındı duvarlar kapatıldı, sol odacıkta yer alan kafes içerisindeki fare, sağ odacığa denek görmeyecek şekilde alındı, sol odacığa ise başka bir yabancı fare kafes içerisinde yerleştirildi. Son durumda denek hala ortadaki odacıkta, duvarlar kapalı iken, sol odacıkta yeni bir yabancı fare, sağ odacıkta ise ilk 10 dakika tanıdığı fare yer almakta idi. Duvarların kaldırılması ile deneyin üçüncü ve son kısmına geçildi, 10 dakikalık kayıt alındı ve analize dahil edildi. Kayıt sonrası denek kafesine bırakıldı. Deneğin, 10 dakika tanıdığı fare ile yeni konulan yabancı fareye olan davranışları tespit edildi. Deneyin ilk 10 dakikasında sosyalleşme ölçümlenirken, ikinci 10 dakikasında sosyal yenilik ölçümlenmektedir. Deneyin ilk 10 dakikalık bölümü ile, ikinci 10 dakikalık bölümü aynı şartlar altında gerçekleştirildi. Testin iki kısmında da deneğin, yabancı fareleri görmemesi sağlandı. Yabancı farelerin, denek fare ile aynı ırk ve yaş ile yakın ağırlıkta olmasına özen gösterildi, yabancı fareler herhangi bir kimyasala ya da teste tabi tutulmadılar, analizde değerlendirilmediler. Yabancı fareler de kendi içerisinde numaralandırıldı ve teste alınan fareler ile bir defadan fazla karşılaşmamaları sağlandı. 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin yapıldığı gün deneklere başka bir test yapılmadı.

Görüntüler Media Recorder 3 (Noldus) programıyla bilgisayar ortamında kaydedildi ve kaydedilen videolar Ethovision XT 11,5 (Noldus, Hollanda) Mouse Behavior modülü kullanılarak analiz edildi.



**Şekil 2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik test düzeneği**

### **Yükseltilmiş Artı Labirent (Elevated Plus Maze) Testi**

Keşifsel bir model olan yükseltilmiş artı labirent testi, ilk olarak 1985 yılında tanımlanmıştır (67,68). Bu test, yerden belirli bir yükseklikte, 2 açık kol, 2 kapalı kol ve bunların birleştiği merkez bölümden oluşan artı şeklinde hazırlanmış bir deney düzeneğidir. Açık kollar ile kapalı kollar karşılıklı konumlanmış olup, düzenek 50 cm x 10 cm boyutlarındadır. Üst kısmı açık olan kapalı kolların çevresi 40 cm yüksekliğinde pleksiglas materyalden oluşur (Şekil 3). Yükseltilmiş labirent testi, boş ve sessiz bir odada gerçekleştirilmiştir.

Açık ve kapalı kolların birleştiği merkez bölümüne fare bırakıldıktan sonra, düzeneğin üzerinde tavana sabitlenmiş kamera ile her bir fare için 5 dakikalık kayıt alındı. Kayıt edilen videolar Ethovision XT 11,5 (Noldus, Hollanda) programı aracılığıyla analiz edildi. Kayıt sonrası fare düzenekten alınıp kafesine konulduktan sonra her seferinde düzenek %10'luk etanol ile silindi ve kurutuldu.



**Şekil 3. Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği**

### **Hot Plate Testi**

Termal ağrı duyusunu ölçen sensörimotor bir test olan hot plate testini 1944 yılında ilk kez Woolfe ve McDonald tanımlamış, daha sonra Eddy ve Leimbach testi geliştirmiştir (69). Bu test genellikle farelerde ağrı hassasiyetinin değerlendirilmesinde kullanılır. Denekler standart ısıtılmış (55 °C) bir levha üzerine bırakıldı ve belirli bir süre bu levha üzerinde kalmaları sağlanan deneklerin hareketleri gözlemlendi. Denek levha üzerine bırakıldığı anda süre başladı, hayvanın levhanın ısınması ile ayağını yalaması, ayağını levha üzerinden kaldırması ya da zıplama hareketi göstermesi deneyi sonlandırdı. Aradaki süre kayıt edildi. Hayvanda doku hasarı meydana gelmemesi amacıyla *cut-off* (sonlandırma) süresi 25 saniye ile sınırlı tutuldu (Şekil 4).





**Şekil 4. Hot Plate Cihazı**

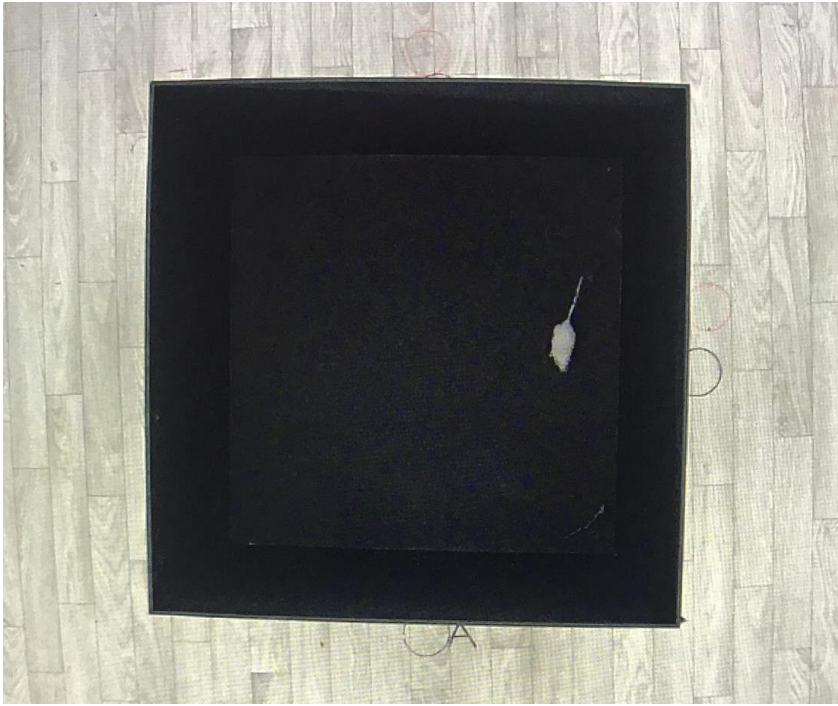
### **Açık Alan (Open Field) Testi**

Kemirgenlerin anksiyete ve lokomotor aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan açık alan testi, ilk kez 1936 yılında Hall tarafından tanımlanmıştır ve günümüzde de popülerliğini koruyan bir testtir. Bu test deney hayvanlarının genel aktivite düzeylerinin, lokomotor aktivitelerinin ve keşif alışkanlıklarının belirlenmesinde kullanılan basit bir sensorimotor testtir. Hall ve arkadaşlarınca tabanı daire şeklinde tanımlanan testin, kare şeklinde olanı 1971 yılında Soubrie tarafından geliştirilmiştir (67).

Beyaz renkli deney faresi, üzeri açık, dört yüzü ve tabanı siyah mat pleksiglas malzemeden (60 cm x 60 cm) oluşan panellerle kapalı bir alana alındı ve arka ayaklar üzerine kalkma, sıçrama gibi hareketleri gözlemlendi (Şekil 5). Düzeneğin üzerinde tavana

sabitlenmiş bir kamera aracılığıyla elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi. Deneyin gerçekleştirildiği oda boş ve sessizdi.

Deneye, farenin düzeneğin tam merkezine bırakılmasıyla başlandı ve 10 dakikalık kayıt alındı. Kayıt sonrası fare kafesine geri bırakıldı. Kayıt edilen videolar Ethovision XT 11,5 (Noldus, Hollanda) programı aracılığıyla analiz edildi. Her denek sonrası düzenek %10'luk etanol ile silindi ve kurutuldu. Bu test ile deneklerin toplam kat ettikleri mesafe, düzeneğin merkezinde geçirdiği süre ve arka ayakları üzerinde durma (*rearing*) sayıları tespit edildi.



**Şekil 5. Açık alan test düzeneği**

### **WESTERN BLOTTING PROTOKOLÜ**

Doku örnekleri beynin hipokampus bölgesinden punch biyopsi ile alındıktan sonra tartıldı ve kayıt edildi. Dokular tüm gruplar tamamlanana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Örnekler ağırlıklarına uygun miktarda proteaz ve fosfataz inhibitör içeren doku ekstraksiyon tamponu ile muamele edildi,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de cam boncuk kullanılarak homojenizasyon yapıldı. 30 dakika buz üzerinde inkübe edilen örnekler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatantı alınan örnekler, tekrar santrifüj edildi. Örneklerin protein miktarları, üretici firmanın önerdiği prosedüre uygun olarak *Qubit Fluorometer* ile ölçüldü. Bu aşamada protein miktarı belirlenen

tüm örnekler, eşit miktarda protein içerecek şekilde, örnek tamponu (*sample buffer*), örnek indirgeyici (*sample reducing agent*) ve distile su miktarları da hesaplanarak yüklenmek üzere hazırlandı. Yürütme tamponu (*running buffer*) hazırlandı. Bakılacak olan proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olan hazır jelde (Nupage %4-12 Bis-tris gel) dikey elektroforezde yürütüldü. Yürütülen örnekler *iblot semidry blotting* sistemi kullanılarak nitroselülöz membrana transfer edildikten sonra, membran *Western Breeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen by Life Technologies)* kullanılarak örneklerdeki GLT-1 ve B-aktin miktarları ölçüldü. Bunun için membran; 30 dk süreyle bloklama solüsyonunda bekletildikten sonra 2 kez ultra saf su ile 5 dk yıkandı. Rabbit *Polyclonal EAAT2/GLT1* (Novus NBP1-20136) antikorunu bloklama solüsyonunda 1/1000 dilüsyonda hazırlandı, bir gece +4°C’de çalkalayıcıda bekletilerek primer antikorun membrana aktarılmış olan GLT-1’e bağlanması sağlandı. Membran, kit içinde hazır bulunan yıkama solüsyonunda 3 kez 10 dk yıkılarak bağlanmamış primer antikor uzaklaştırıldı, sonra 30 dk boyunca yine kit içinde hazır bulunan sekonder antikora maruz bırakıldı. Membran, üç kez 10 dk yıkama solüsyonunda yıkandıktan sonra, 2 kez 5 dk distile su ile yıkandı. Bu işlemler sonunda membran görüntü alma aşaması için hazır hale getirilmiş oldu. Kit içinde hazır bulunan kemiluminesans ile 5 dk muamele edilen membran, TÜTAGEM’de bulunan *Chemidoc™ MP Imaging System* (Model No: Universal Hood 3, Biorad) cihazı kullanılarak görüntülendi. Daha sonra aynı membranlara hazır olarak alınan *Restore Western Blot, Stripping Buffer (Thermo Fisher 21059)* kullanılarak protokolüne uygun şekilde yıkama yapıldı. Aynı membranlar bu kez 1/1000 dilüsyonda *Rabbit Polyclonal beta-Actin Antibody* (Novus NB600-503) ile +4°C’de bir gece çalkalayıcıda bekletildi. GLT-1 için yapılan işlemler aynı sırayla tekrarlandı ve görüntüleme yapıldı.

## İMMÜNOHİSTOKİMYA PROTOKOLÜ

İmmünohistokimyasal incelemeler için parafine gömülen beyin dokusu örneklerinden 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve bir gece 56°C’lik etüvde bekletildi. Ardından toluol (Merck) ile deparafinizasyon ve düşen alkol serileri (%100-%70) ile rehidrasyon işlemleri uygulanan preparatlar, antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (pH 6, Invitrogen) kaynatıldı. Sonrasında kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abcam, Cambridge, ABD)’ye maruz bırakıldı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (Invitrogen) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dilüe etme solüsyonuyla

(Invitrogen) hazırlanan EAAT2/GLT1 antikorunda (Novus Biologicals, NBP1-59632) gece boyu +4°C’de bekletildi. Primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10 dk. oda ısısında tutuldu ve son olarak *HRP-streptavidin* (Invitrogen) ile 10 dk muamele edildi. *DAB* (Invitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin ile zıt boyaması yapıldı ve entellanla kapatıldı. Hazırlanan preparatlar *BX-51 Olympus* marka araştırma mikroskobunda incelenerek, fotoğrafları çekildi.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistik kullanıldı. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, yükseltilmiş artı labirent testi, açık alan testi, hot plate testi, immunohistokimyasal inceleme ve western blotting sonuçlarının analizinde, ikili karşılaştırmalarda eşleştirilmemiş t testi, çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi, ANOVA ve *post hoc* Bonferroni testi kullanıldı. Analizler Graphpad Prism 6.0 for Mac OS X yazılımında gerçekleştirildi ve  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.

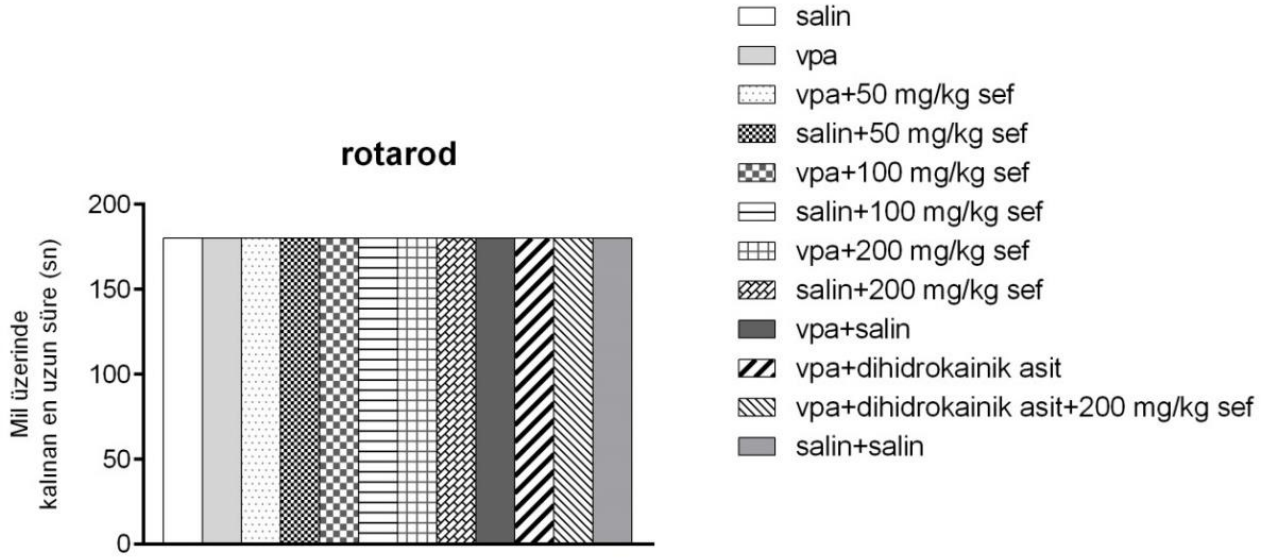
## **BULGULAR**

Bu çalışmada intrauterin 12,5. günde VPA ya da salin enjeksiyonu yapılan gruplarda farklı dozlarda seftriaksonun (50, 100, 200 mg/kg) davranış üzerine etkileri incelenmiş ve hipokampüste GLT-1 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler immunohistokimyasal inceleme ve western blotting ile değerlendirilmiştir. Rota rod testi, üç odalı sosyal etkileşim ve sosyal yenilik testi, yükseltilmiş artı labirent testi, hot plate ve açık alan testi bütün gruplarda aynı sırayla ve 54-57. günler arasında gerçekleştirildi.

Çalışmadan elde edilen veriler dört ayrı bölümde sunulacaktır. Birinci bölümde davranış deneyleri ve GLT-1 ekspresyonu üzerine VPA'nın etkisi, ikinci bölümde VPA alan gruplarda farklı dozlarda uygulanan seftriaksonun etkisi, üçüncü bölümde dihidrokainik asit etkisi ve son olarak da salin alan gruplarda farklı dozlarda uygulanan seftriaksonun etkisi sırasıyla verilecektir. Rotarod testi verileri tüm gruplar için tek grafik halinde sunulacaktır.

### **ROTAROD TESTİ VERİLERİ**

Denekler, 54 günlük olduklarında ilk test olan rotarod testine tabi tutuldular. Deneklerin mil üzerinde geçirdikleri en uzun süreler (Şekil 6)'da gösterilmiştir. Bu grafikte de görüldüğü gibi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu Bu durum gebelik döneminde uygulanan VPA'nın ve postnatal 47-57. günler arasında uygulanan farklı dozlarda seftriaksonun deneklerin motor fonksiyonunu ve denge yeteneğini bozmadığı yönünde yorumlandı. Deneklerin hepsi mil üzerinde 180 saniye durduklarından garfiklerde standart hata sıfırdır.



**Şekil 6. Rotarod testi, mil üzerinde kalınan en uzun süre**

(n=8, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

## İNTRAUTERİN VALPROİK ASİTİN ETKİLERİ

### Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi Verileri

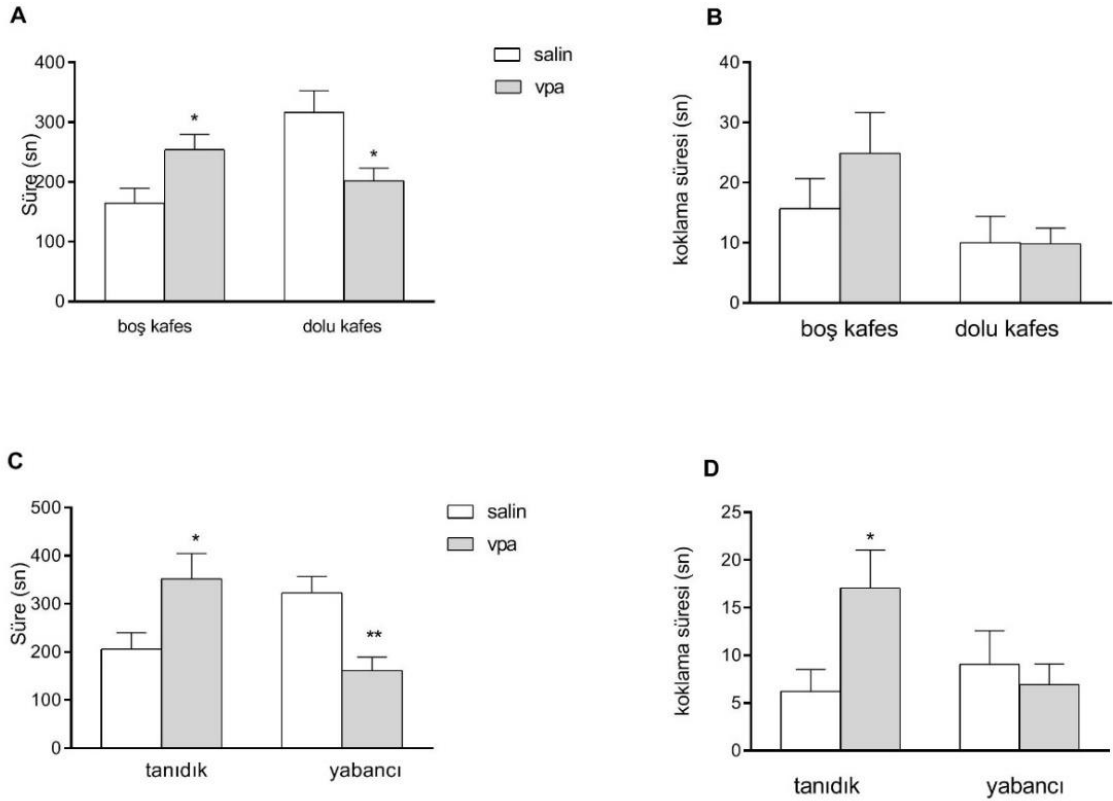
Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testine başlamadan önceki gün deneklerin ortamını tanımları ve alışmaları için yarım saat süreyle test düzeneğine konuldu. 55. gün üç bölümden oluşan test gerçekleştirildi. İlk 5 dakikalık bölümünde herhangi bir analiz yapılmayan testte ilk 10 dakikalık bölümde deneklerin sosyal etkileşimleri değerlendirildi. İkinci 10 dakikalık bölümde ise deneklerin tanıdık ve yabancı hayvanlar ile etkileşimi ölçülerek sosyal yeniliğe uyumu değerlendirildi.

Deneyin ilk bölümünde, deneğin boş kafesin ve yabancı farenin olduğu kafesin etrafında geçirdiği süre açısından gruplar karşılaştırıldı (Şekil 7A ve Şekil 7B). İntrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan annelerden doğan erkek farelerin dolu kafesin bulunduğu bölmede geçirdikleri süre salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derece azdı ( $p=0,0229$ ; eşleştirilmemiş t testi). Deneyin bu aşamasında deneklerin boş kafesi ve dolu kafesi koklama süreleri açısından bir fark görülmedi ( $p=0,2959$ ; eşleştirilmemiş t testi).

Bu testin ikinci aşamasında, deneğin tanıdık fare ile yabancı fare çevresinde geçirdiği süre ve kafes içindeki hayvanları koklama süreleri, sosyal yeniliklere uyumu ve aynılıkta ısrarı değerlendirmede kullanıldı (Şekil 7C ve Şekil 7D). VPA'ya maruz kalan farelerin,

tanıdık fare ile geçirdikleri süre daha fazla olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,0375$ ; eşleştirilmemiş t testi). İntrauterin dönemde VPA'ya maruz kalan farelerin, tanıdık fareyi koklama süreleri de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı ( $p=0,0335$ ; eşleştirilmemiş t testi).

Testin birinci bölümü ve ikinci bölümünden elde edilen veriler birlikte yorumlandığında intrauterin dönemde VPA'ya maruz kalan erkek farelerin hem sosyalleşme hem de sosyal yeniliğe uyum sağlamada daha zayıf olduğu sonucuna varılabilir.



**Şekil 7. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi. A) Deneklerin boş kafes ve dolu kafes bölümlerinde geçirdikleri süre B) Deneklerin kafesleri koklama süreleri C) Deneklerin tanıdık ve yabancı hayvanların bulunduğu kafeslerin yanında geçirdikleri süre D) Deneklerin kafesleri koklama süreleri**

(\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; salin grubuna karşı  $n=8$ , eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

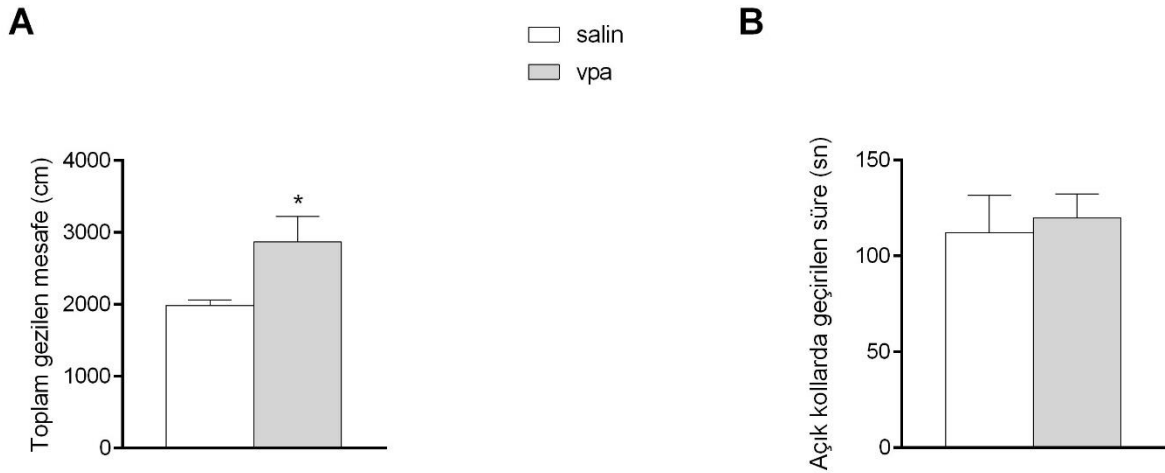
### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Verileri

Çalışmamızın 56. gününde yükseltilmiş artı labirent testine geçildi. Bu testte deneğin, açık kollarda geçirdiği süre ile düzenekte toplam gezilen mesafe analiz edildi.

Yükseltilmiş artı labirent testinde, intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerin, salin uygulanan gruba kıyasla açık kollarda geçirilen süre bakımından değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p=0,7341$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 8A).

Aynı testte, intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerin, salin uygulanan gruba göre artı labirent üzerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p=0,0362$ ; eşleştirilmemiş t testi) daha çok gezindikleri görüldü (Şekil 8B).

Elde edilen veriler birlikte yorumlandığında VPA uygulanan farelerin kontrol grubuna kıyasla test düzeneğinin açık ve kapalı kollarında benzer sürelerde hareket ettikleri, VPA uygulanan grubun bu testte anksiyete benzeri davranış açısından bir fark oluşturmadığı görüldü.



**Şekil 8. Yükseltilmiş artı labirent testi. A) Toplam gezilen mesafe B) Açık kollarda geçirilen süre**

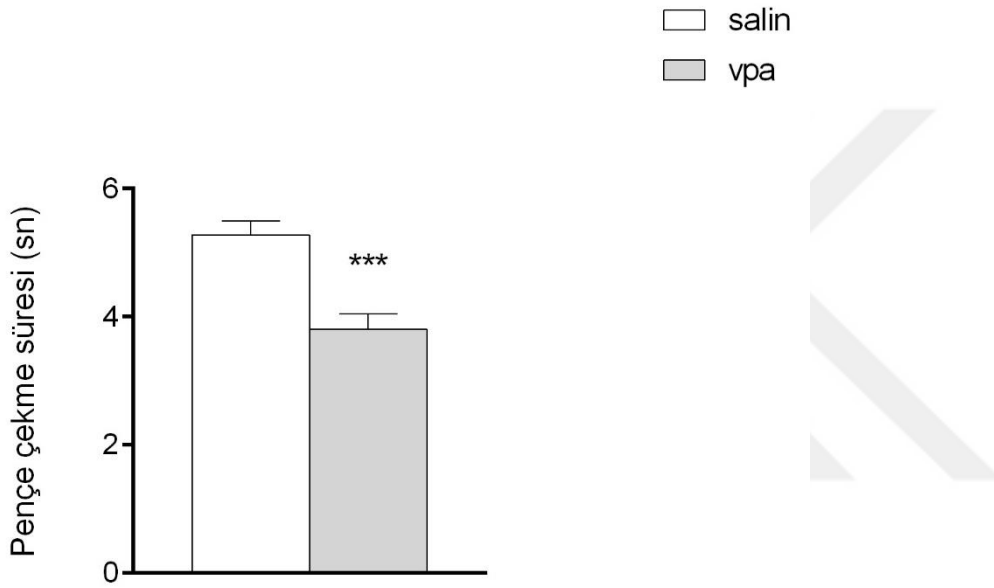
(\*:  $p<0,01$ ; salin grubuna karşı.  $n=8$ , eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)



### Hot Plate Testi Verileri

Çalışmamızın 56. gününde hot plate test düzeneğinde denekler 55°C'ye ısıtılmış plaka üzerine bırakılarak, ağırlı uyarana verdikleri yanıt analiz edildi.

Hot plate testinde intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerin, salin uygulanan gruba kıyasla sıcak plaka üzerinden ayak çekme süreleri kıyaslandığında, VPA uygulanan deneklerin ayaklarını plakadan istatistiksel olarak anlamlı derecede erken çektikleri görüldü ( $p=0,0004$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 9).



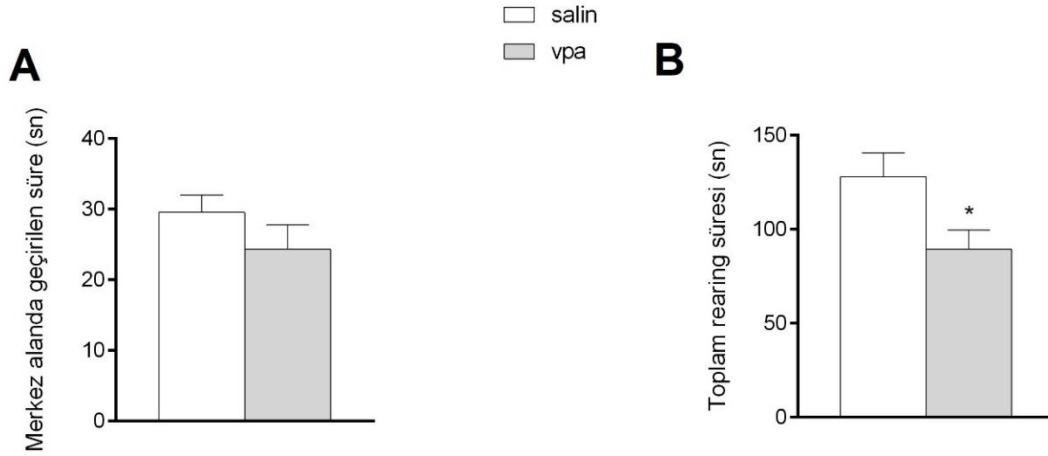
**Şekil 9. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri**

(\*\*\*:  $p<0,001$ ; salin grubuna karşı.  $n=8$ , eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Açık Alan Testi Verileri

Deneklerin anksiyete düzeyleri ve araştırmacı davranışlarının incelendiği bu testte, deneklerin merkez alanda geçirdikleri süre ile *rearing* süreleri hesaplandı.

Açık alan testinde intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek fareler ile salin uygulanan gruptan doğan farelerin merkez alanda geçirdikleri süre kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ( $p= 0,2520$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 10A), toplam *rearing* süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p= 0,0312$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 10B).



**Şekil 10. Açık alan testi. A) Merkezde geçirilen süre B) Toplam rearing süresi**

(\*:  $p < 0,05$ ; salin grubuna karşı.  $n=8$ , eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

## SEFTRİAKSONUN VALPROİK ASİTE MARUZ KALAN GRUPLAR ÜZERİNE ETKİSİ

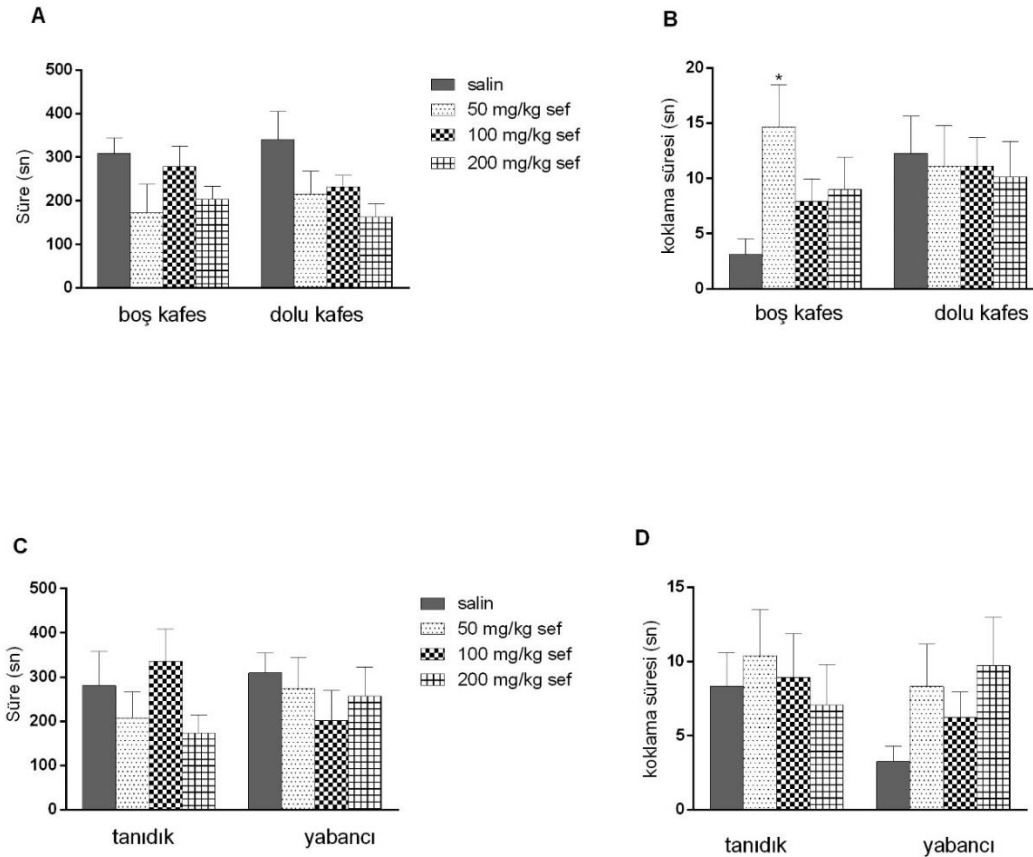
Çalışmamızda otizm üzerinde seftriaksonun etkisini incelemeyi amaçladık. Bu sebeple intrauterin dönemde 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelere kontrol grubu salin uygulanmak üzere, sırasıyla seftriakson (50 mg/kg), seftriakson (100 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg) uygulandı. Bu dört grupta yer alan deneklere de çalışmamızda seçtiğimiz davranış deneyleri olan; rotarod, üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, yükseltilmiş artı labirent testi, hot plate testi, açık alan testi sırasıyla uygulandı. Rotarod testi verileri için, (Şekil 6)'da görüldüğü gibi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

### Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi Verileri

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ilk bölümünde, deneğin boş kafesin ve yabancı farenin olduğu kafesin etrafında geçirdiği süre açısından gruplar değerlendirildi (Şekil 11A ve Şekil 11B). Kontrol grubu ile farklı dozlarda seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan gruplar arasında bölmelerde geçirilen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p=0,1566$ ; ANOVA). Deneyin bu aşamasında deneklerin boş kafesi ve dolu kafesi koklama süreleri açısından da sadece 50 mg/kg seftriakson uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görüldü ( $p=0,0506$ ; ANOVA).

Bu testin ikinci aşamasında, deneğin tanıdık fare ile yabancı fare çevresinde geçirdiği süre ve kafes içindeki hayvanları koklama süreleri, sosyal yeniliklere uyumu ve aynılıkta ısrarı değerlendirildi (Şekil 11C ve Şekil 11D). Kontrol grubu ile farklı dozlarda seftriakson uygulanan gruplar arasında kafeslerin çevresinde geçirilen süre bakımından istatistiksel anlamlı fark görülmedi ( $p=0,2885$ ; ANOVA). İntrauterin dönemde VPA'ya maruz kalan farelerin, tanıdık fareyi koklama sürelerine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2763$ ; ANOVA).

Testin birinci bölümü ve ikinci bölümünden elde edilen veriler birlikte yorumlandığında intrauterin dönemde VPA'ya maruz kalan farelerden doğan farelere uygulanan seftriaksonun hem sosyalleşme hem de sosyal yeniliğe uyumu artırma yönünde bir etkisi olmadığı sonucuna varılabilir.

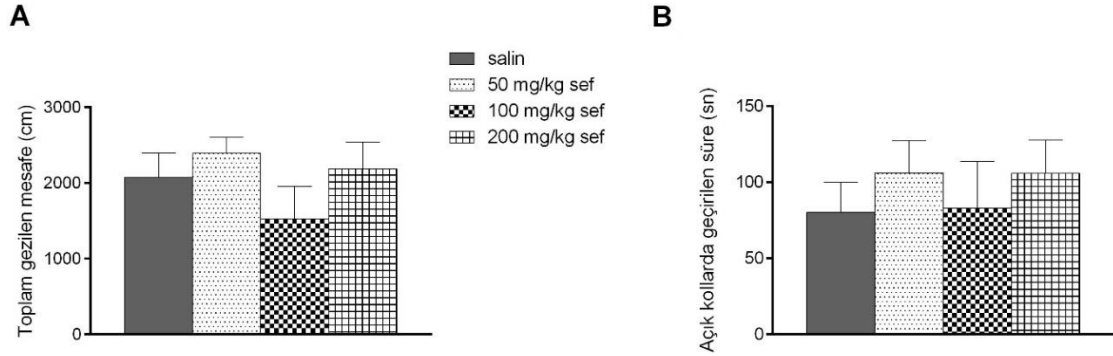


**Şekil 11. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi. A) Deneklerin boş kafes ve dolu kafes bölümlerinde geçirdikleri süre B) Deneklerin kafesleri koklama süreleri C) Deneklerin tanıdık ve yabancı hayvanların bulunduğu kafeslerin yanında geçirdikleri süre D) Deneklerin kafesleri koklama süreleri**

(\*:  $p<0,05$ ; salin grubuna karşı  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Verileri

Yükseltilmiş artı labirent testinde, intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerden, sırasıyla artan dozlarda seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan gruplarda salin uygulanan gruba kıyasla hem toplam gezilen mesafe hem de açık kollarda geçirilen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla  $p=0,7885$ ,  $p=0,3352$ ; ANOVA) (Şekil 12A ve Şekil 12B).

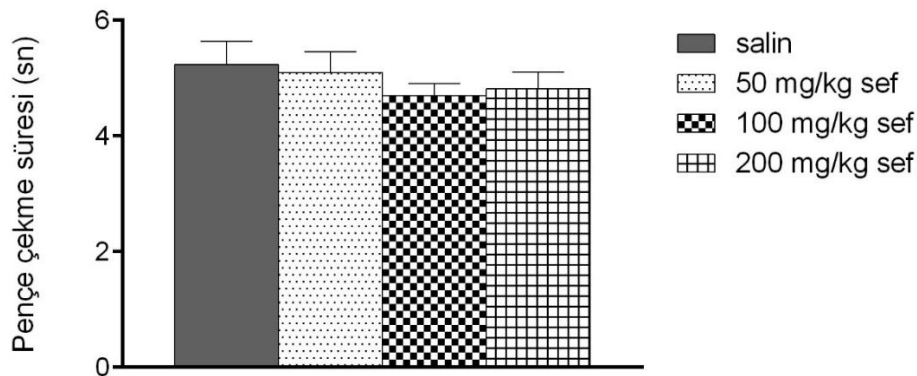


**Şekil 12. Yükseltilmiş artı labirent testi. A) Toplam gezilen mesafe B) Açık kollarda geçirilen süre**

(n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Hot Plate Testi Verileri

Hot plate testinde intrauterin dönemde VPA'ya maruz kalan farelerden postnatal 47-57. günler arası farklı dozlarda seftriakson uygulanan grupların salin uygulanan gruba göre ayaklarını sıcak plakadan çekme sürelerinde bir fark yoktu ( $p=0,6308$ ; ANOVA) (Şekil 13).

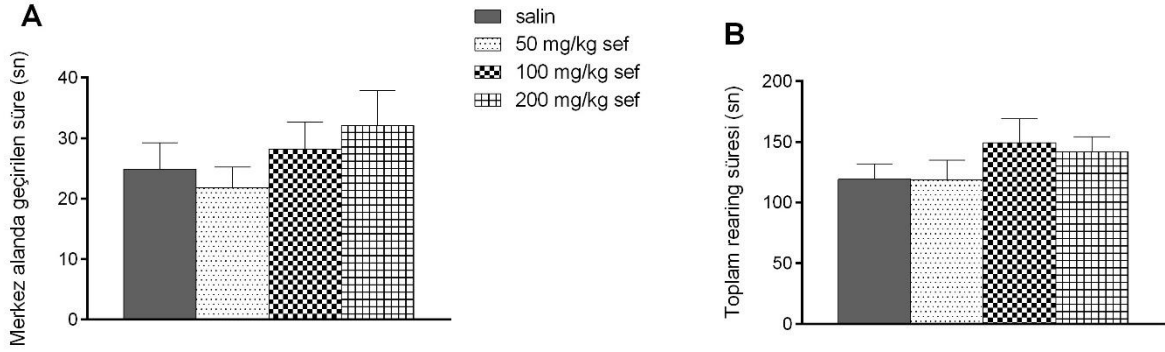


**Şekil 13. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri**

(n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Açık Alan Testi Verileri

Açık alan testinde intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerden seftriakson uygulanan gruplarla salin uygulanan grup arasında ne merkez alanda geçirilen süre ne de toplam *rearing* süreleri açısından herhangi bir fark olmadığı görüldü. (sırasıyla  $p=0,2520$  ve  $p=0,4045$ ; ANOVA) (Şekil 14A ve Şekil 14B).



**Şekil 14. Açık alan testi. A) Merkez alanda geçirilen süre B) Toplam *rearing* süresi**

(n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### DİHİDROKAINİK ASİTİN ETKİLERİ

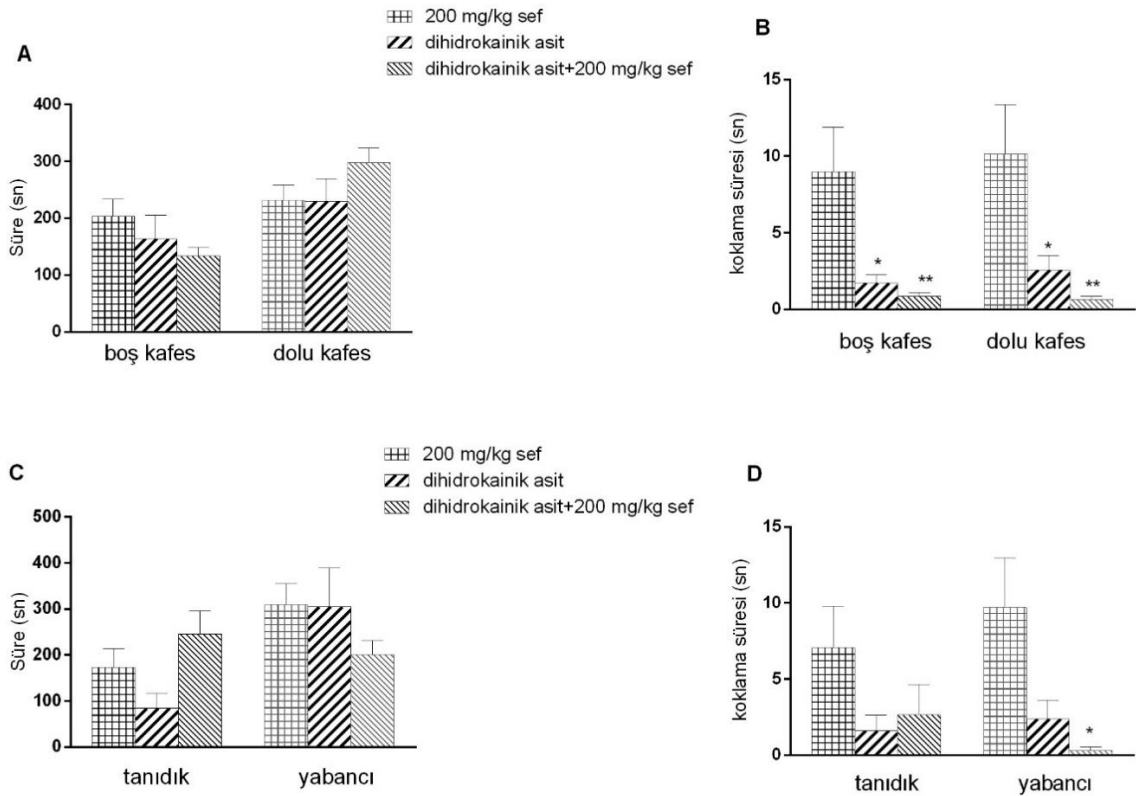
Çalışmamızda kullandığımız seftriaksonun etkisini GLT-1 üzerinden yapıp yapmadığımızı anlayabilmemiz amacıyla, en yüksek dozda (200 mg/kg) seftriakson ile birlikte selektif GLT-1 taşıyıcı inhibitörü olan dihidrokainik asit uygulandı. Daha önce yapılan çalışmalarda, 200 mg/kg dozda GLT-1 ekspresyonunda artış görülmesi nedeniyle bu doz seçildi (70). İntrauterin dönemde 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelere sırasıyla üç farklı grupta, seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokaïnik asit (10 mg/kg) uygulandı. Rotarod testi verileri için, (Şekil 6)'da görüldüğü gibi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

### Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi Verileri

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ilk bölümünde, deneğin boş kafesin ve yabancı farenin olduğu kafesin etrafında geçirdiği süre ve kafesleri koklama süreleri açısından değerlendirildi (Şekil 15A ve Şekil 15B). Seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokaïnik asit (10 mg/kg) uygulanan grup arasında bölmelerde geçirilen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p=0,2496$ ;

ANOVA). Deneklerin kafesleri koklama süreleri değerlendirildiğinde ise dihidrokainik asit hem tek başına hem de seftriaksonla birlikte uygulandığında deneklerin koklaşma süresini istatistiksel olarak azalttığı görüldü.

Bu testin ikinci aşamasında, deneğin tanıdık fare ile yabancı fare çevresinde geçirdiği süre ve kafes içindeki hayvanları koklama süreleri, sosyal yeniliklere uyumu ve aynılıkta ısrarı değerlendirmede kullanıldı (Şekil 15C ve Şekil 15D). Seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokinik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar arasında bölmelerde geçirilen süreler açısından fark yoktu ( $p=0,0516$ ; ANOVA). Kafesleri koklama süresi açısından değerlendirildiğinde seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokinik asit (10 mg/kg) uygulanan grupta, sadece seftriakson alan gruba kıyasla yabancı hayvanı koruma açısından istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı ( $p=0,0205$ ; ANOVA).

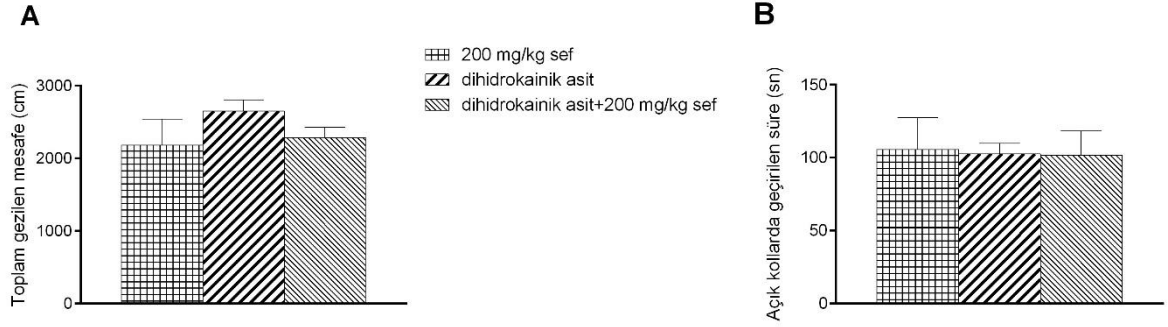


**Şekil 15. Üç odalı sosyalite ve sosyal yenilik testi. A) Deneklerin boş kafes ve dolu kafes bölümlerinde geçirdikleri süre B) Deneklerin kafesleri koklama süreleri C) Deneklerin tanıdık ve yabancı hayvanların bulunduğu kafeslerin yanında geçirdikleri süre D) Deneklerin kafesleri koklama süreleri**

(\*:  $p<0,05$ , \*\* $p <0,01$ ; vpa+200 mg/kg sef grubuna karşı,  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Verileri

Yükseltilmiş artı labirent testinde, seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokaïnik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar arasında açık kollarda geçirilen süre ve toplam gezilen mesafe açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (sırasıyla  $p=0,9841$  ve  $p=0,3957$ ; ANOVA) (Şekil 16A ve Şekil 16B).

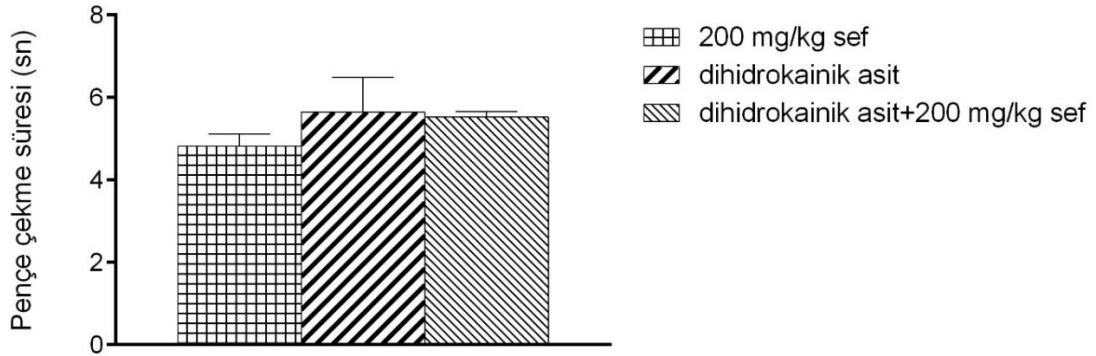


**Şekil 16. Yükseltilmiş artı labirent testi. A) Toplam gezilen mesafe B) Açık kollarda geçirilen süre**

( $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Hot Plate Testi Verileri

Hot plate testinde seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokaïnik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar arasında sıcak plaka üzerinden pençe çekme süreleri kıyaslandığında, süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,6308$ ; ANOVA) (Şekil 17).



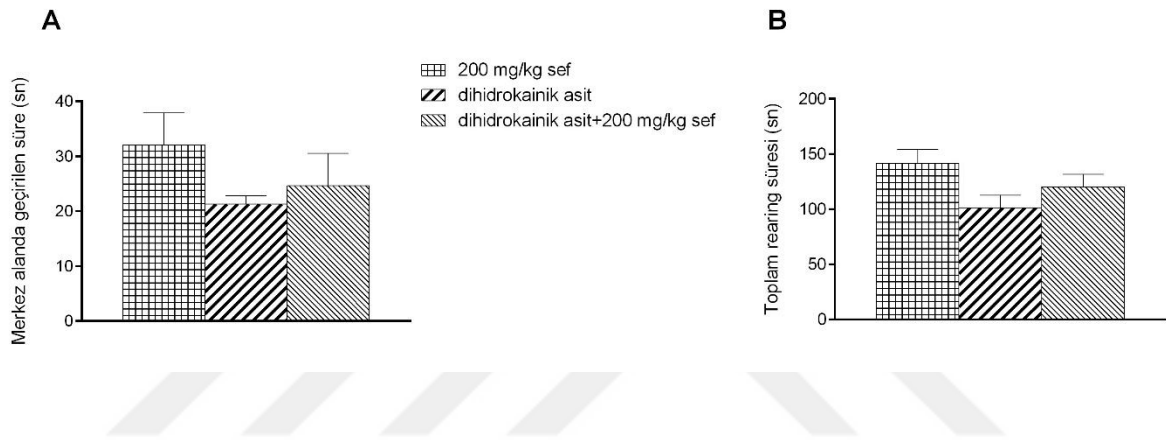
**Şekil 17. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süresi**

( $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Açık Alan Testi Verileri

Açık alan testinde seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokinik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar arasında farelerin merkez alanda geçirdikleri süre kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2520$ ; ANOVA) (Şekil 18A).

Açık alan testinde, seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokinik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar arasında, grupta yer alan farelerin *rearing* sayısı kıyaslandığında da, anlamlı bir fark yoktu ( $p=0,0865$ ; ANOVA) (Şekil 18B).



Şekil 18. Açık alan testi. A) Merkez alanda geçirilen süre B) Toplam *rearing* süresi

( $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### İNTRAUTERİN SALİNE MARUZ KALAN GRUPLARDA SEFTRİAKSONUN ETKİSİ

Çalışmamızda kontrol grubu olarak; intrauterin dönemde 12,5. günde salin uygulanan dişilerden doğan erkek farelere salin ve seftriakson 50, 100 ve 200 mg mg/kg dozlarda uygulandı. Rotarod testindeki performanslar yönünden Şekil 6'da görüldüğü gibi, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

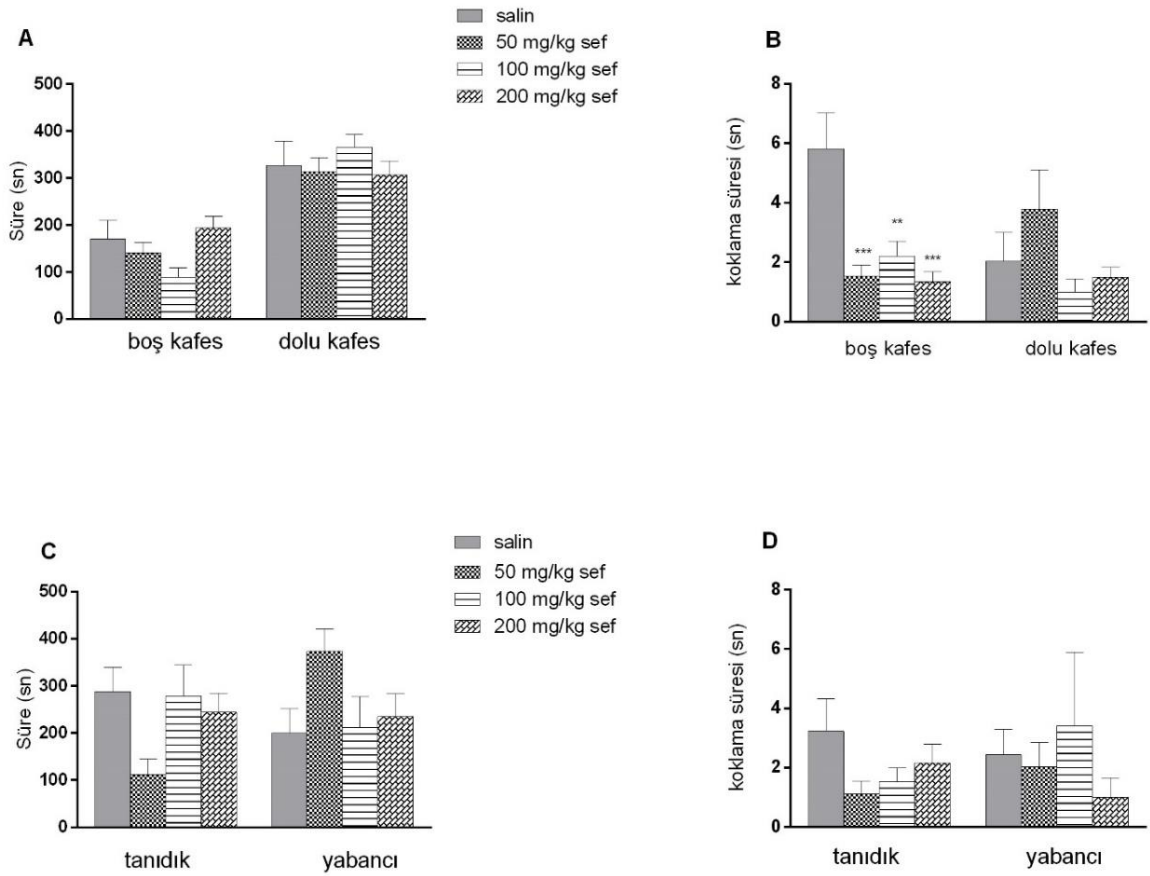


### Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi Verileri

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ilk bölümünde, deneğin boş kafesin ve yabancı farenin olduğu kafesin etrafında geçirdiği süre ve kafesleri koklama süreleri değerlendirildi (Şekil 19A ve Şekil 19B). Salin grubu ile farklı dozlarda seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan gruplar arasında bölmelerde geçirilen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p=0,0705$ ; ANOVA). Deneyin bu aşamasında denekler boş kafesi koklama süreleri açısından değerlendirildiğinde, seftriakson uygulanan gruplardaki değerler salin uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azdı ( $p=0,0003$ ; ANOVA).

Bu testin ikinci aşamasında, deneğin tanıdık fare ile yabancı fare çevresinde geçirdiği süre ve kafes içindeki hayvanları koklama süreleri, sosyal yeniliklere uyumu ve aynılıkta ısrarı değerlendirmede kullanıldı (Şekil 19C ve Şekil 19D). Salin grubu ile farklı dozlarda seftriakson uygulanan gruplar arasında bölmelerde geçirilen zaman açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p=0,1084$ ; ANOVA). İntrauterin dönemde saline maruz kalan farelerin, tanıdık ya da yeni fareyi koklama süreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,6760$ ; ANOVA).

Testin birinci ve ikinci bölümünden elde edilen veriler birlikte yorumlandığında intrauterin dönemde saline maruz kalan erkek farelerden doğan farelere uygulanan seftriaksonun hem sosyalleşme hem de sosyal yeniliğe uyum sağlamada etkisinin olmadığı ya da zayıf olduğu sonucuna varılabilir.

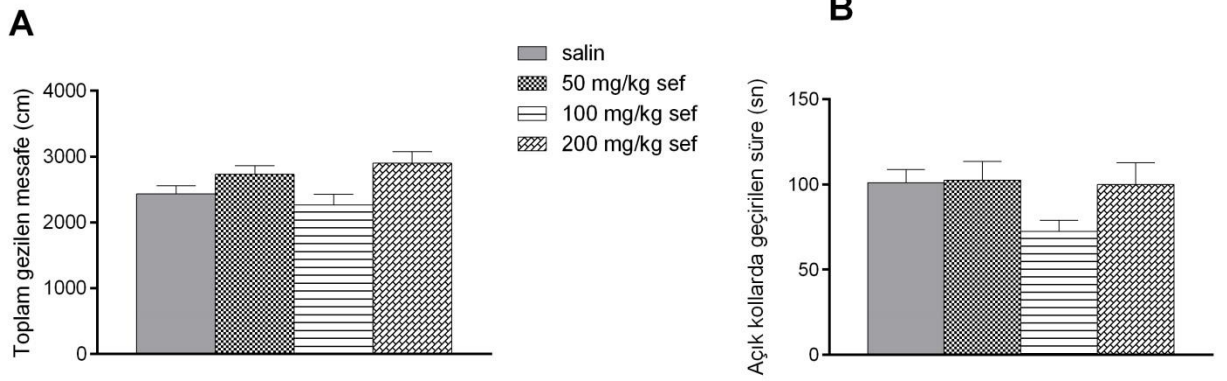


**Şekil 19. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi. A) Deneklerin boş kafes ve dolu kafes bölümlerinde geçirdikleri süre B) Deneklerin kafesleri koklama süreleri C) Deneklerin tanıdık ve yabancı hayvanların bulunduğu kafeslerin yanında geçirdikleri süre D) Deneklerin kafesleri koklama süreleri**

(\*\*p<0,01, \*\*\*p <0,001; salin grubu değerine karşı. n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Verileri

Yükseltilmiş artı labirent testinde, intrauterin 12,5. günde salin uygulanan dişilerden doğan erkek farelerden, salin uygulanan grupta, artan dozlarda seftriakson uygulanan gruplar arasında açık kollarda geçirilen süre ve toplam gezilen mesafe bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (sırasıyla p=0,1207 ve p=0,3957; ANOVA) (Şekil 20A ve Şekil 20B).

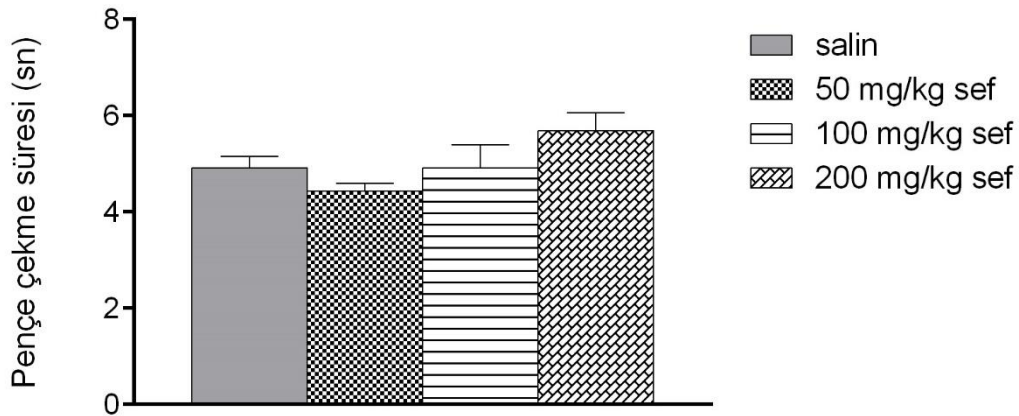


**Şekil 20. Yükseltmiş artı labirent testi. A) Toplam gezilen mesafe B) Açık kollarda geçirilen süre**

(n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

#### Hot Plate Testi Verileri

Hot plate testinde intrauterin 12,5. günde salin uygulanan dişilerden doğan erkek farelerden, salin uygulanan grupta, artan dozlarda seftriakson uygulanan gruplar arasında sıcak plaka üzerinden ayak çekme süreleri kıyaslandığında, süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,0923$ ; ANOVA) (Şekil 21).



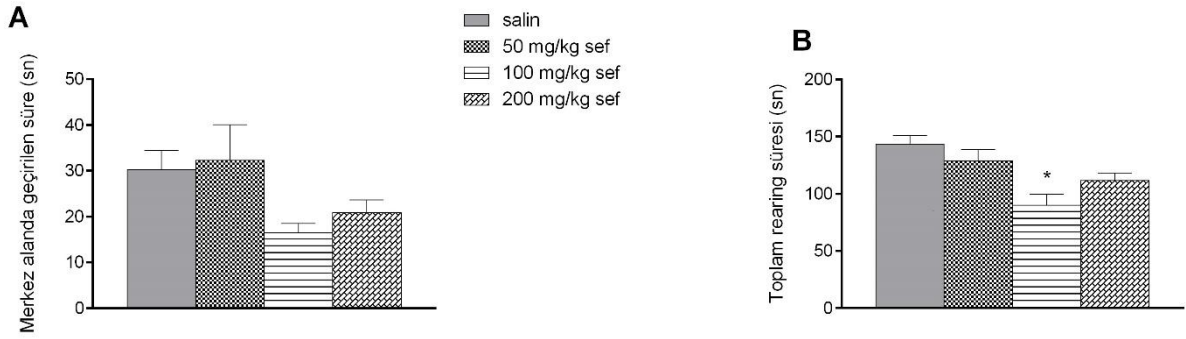
**Şekil 21. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri**

(n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Açık Alan Testi Verileri

Açık alan testinde intrauterin 12,5. günde salin uygulanan annelerden doğan farelerden, salin uygulanan grupta, farklı dozlarda seftriakson uygulanan gruplar arasında farelerin merkez alanda geçirdikleri süre açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2520$ ; ANOVA) (Şekil 22A).

Grupların toplam *rearing* süreleri kıyaslandığında, 100 mg/kg seftriakson uygulanan gruptaki deneklerin arka ayakları üzerine durma süreleri diğer gruptaki deneklere oranla daha azdı ( $p=0,0062$ ; ANOVA) (Şekil 22B).



Şekil 22. Açık alan testi. A) Merkez alanda geçirilen süre B) Toplam *rearing* süresi

(\*:  $p<0,05$ ;  $n=8$ , salin grubu değerine karşı tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### WESTERN BLOTTİNG ANALİZİ VERİLERİ

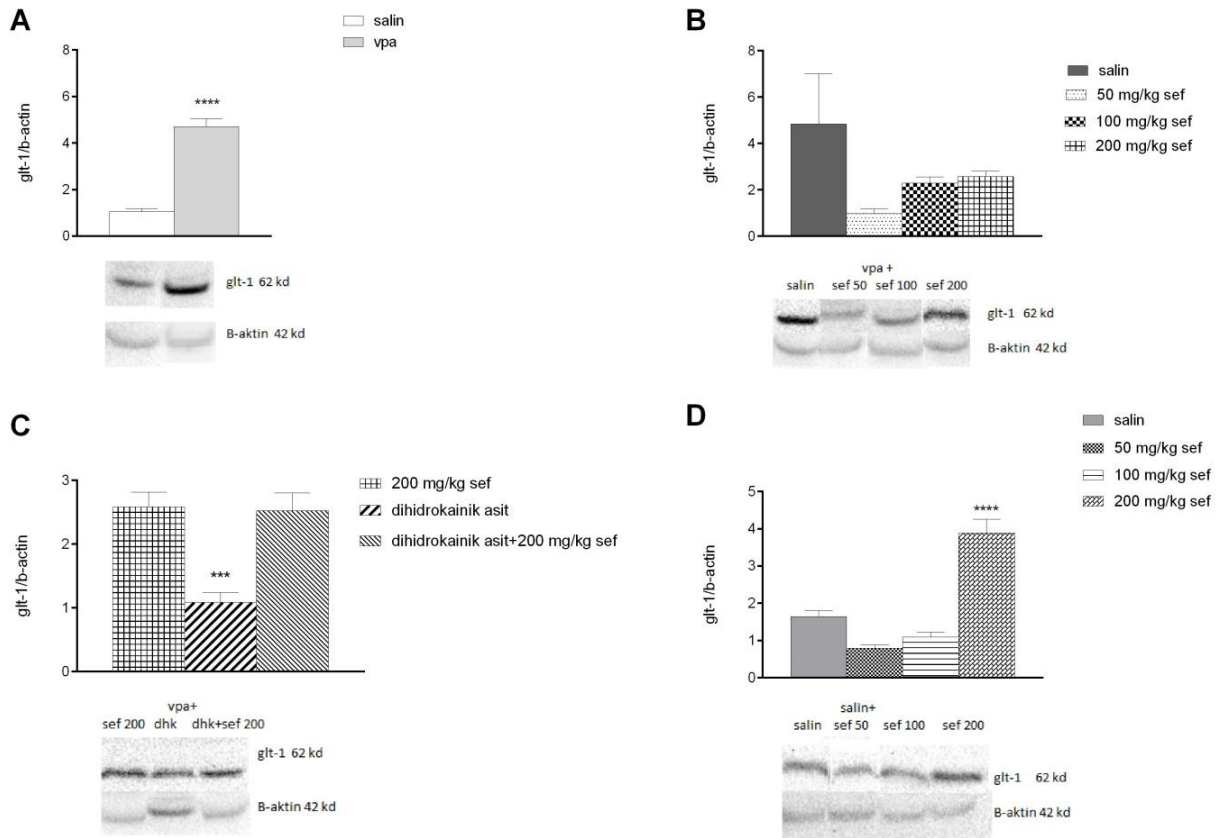
Çalışmamızda yer alan grupların western blotting verilerine baktığımızda, intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerin, salin uygulanan gruba kıyasla, GLT-1/ $\beta$  aktin miktarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü ( $p=0,0001$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 23A).

Postnatal dönemde uygulanan kronik seftriaksonun intrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) enjeksiyonu yapılan gruplardaki etkisini incelediğimiz bölümde, artan dozlarda seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan grupların salin uygulanan gruba oranla GLT-1/ $\beta$  aktin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,1231$ ; ANOVA) (Şekil 23B).

İntrauterin 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan dişilerden doğan erkek farelerden; seftriakson (200 mg/kg), dihidrokainik asit (10 mg/kg) ve seftriakson (200 mg/kg)+dihidrokainik asit (10 mg/kg) uygulanan gruplar kıyaslandığında, sadece

dihidrokinik asit (10 mg/kg) uygulanan grubun GLT-1/ $\beta$  aktin miktarının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı azalmış olduğu görüldü ( $p=0,0006$ ; ANOVA) (Şekil 23C).

İntrauterin 12,5. günde salin uygulanan gruplarda postnatal seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; seftriakson 200 mg/kg uygulanan grubun GLT-1/ $\beta$  aktin miktarının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü ( $p=0,0001$ ; ANOVA) (Şekil 23D).



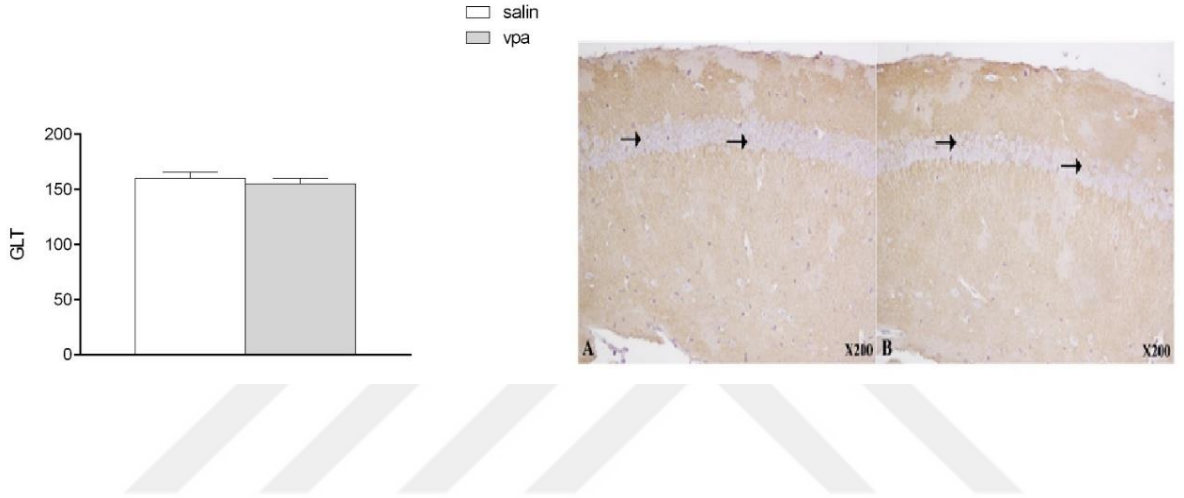
**Şekil 23. Western blotting analizi, GLT-1/ $\beta$  aktin miktarları**

(\*\*\*:  $p < 0,01$ , VPA+200 mg/kg seftriakson grubu değerine göre, \*\*\*\*:  $p < 0,001$ ; salin grubu değerine karşı.  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

## İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME VERİLERİ

### Hipokampus CA1 Bölgesi

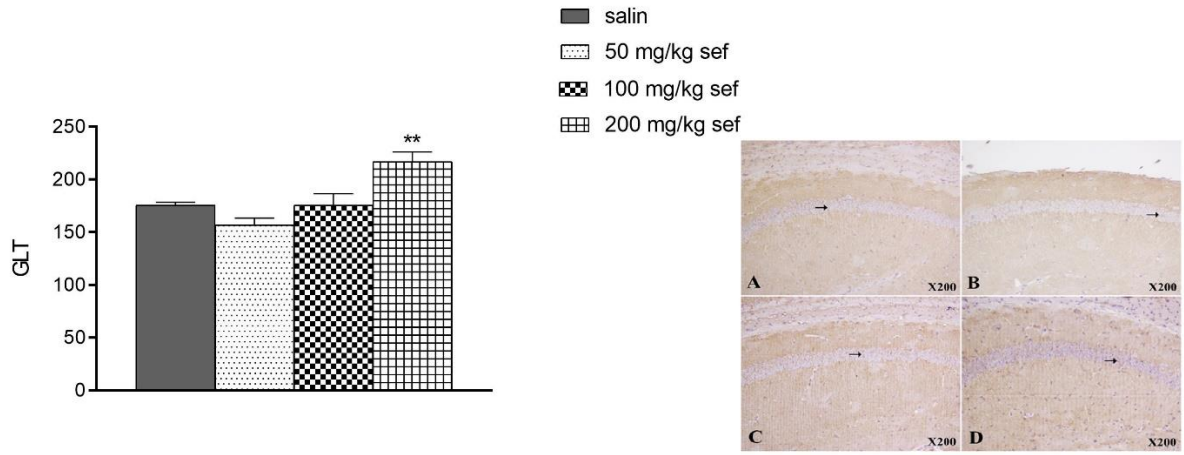
İntrauterin 12,5. günde VPA ve salin enjeksiyonu yapılan gruplar karşılaştırıldığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,5137$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 24).



**Şekil 24. Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit uygulanan grup (B). GLT-1 antikoru ve hematoksilen zıt boyaması, X200. n=8, eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

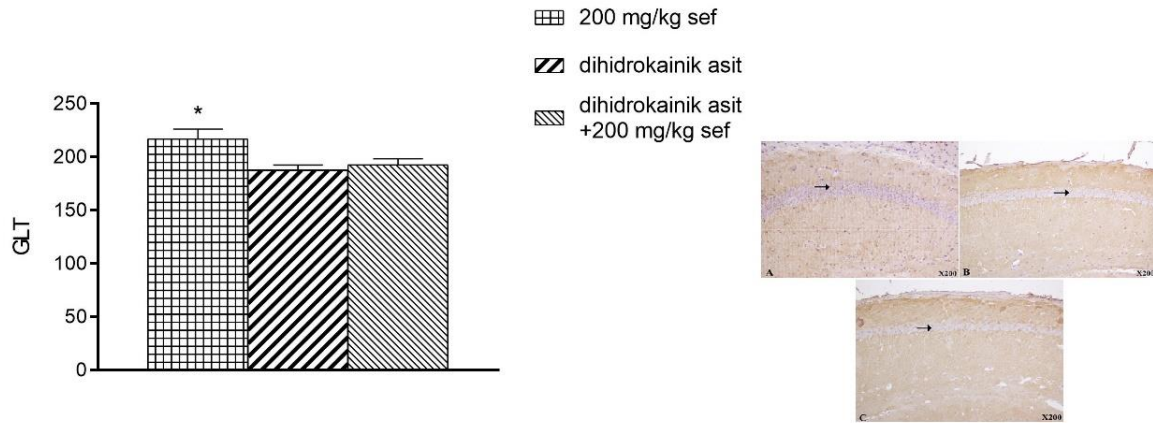
İntrauterin dönemde VPA ve postnatal dönemde salin ve seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında sadece seftriakson 200 mg/kg alan grupta saline göre istatistiksel anlamlı olarak daha belirgin bir boyanma vardı ( $p=0,0001$ ; ANOVA) (Şekil 25).



**Şekil 25. Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikoruna ve hematoksinle zıt boyanması, X200. \*\* $p < 0,01$  vpa+salin grubuna karşı,  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

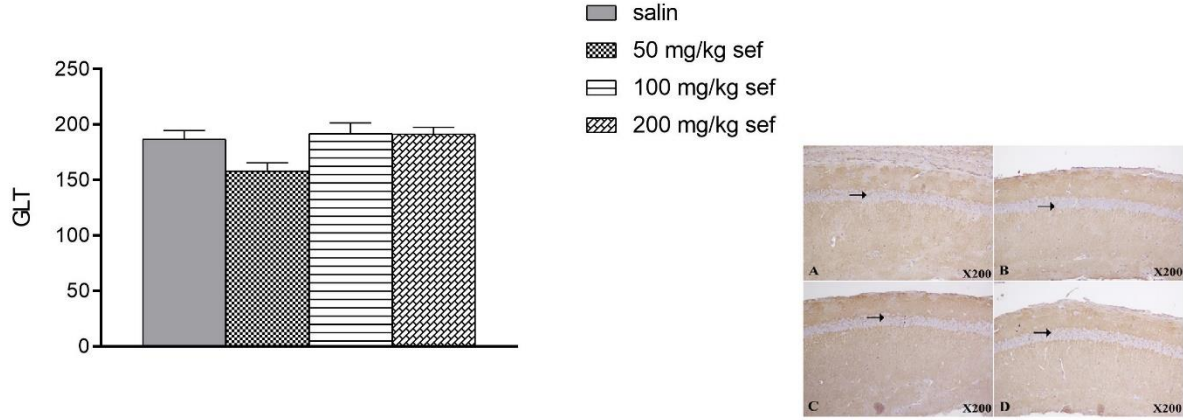
Dihidrokinik asidin etkilerini incelediğimiz gruplarda ise hipokampusun CA1 bölgesindeki boyanmada 200 mg/kg seftriakson alan grupta boyanma daha belirgindi ( $p < 0,0164$ ; ANOVA) (Şekil 26).



**Şekil 26: Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası dihidrokinik asit uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson ile dihidrokinik asit uygulanan grup (C). GLT-1 antikoruna ve hematoksinle zıt boyanması, X200. \*:  $p < 0,05$ , dihidrokinik asit grubuna göre,  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

İntrauterin dönemde salin ve postnatal dönemde seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,0147$ ; ANOVA) (Şekil 27).



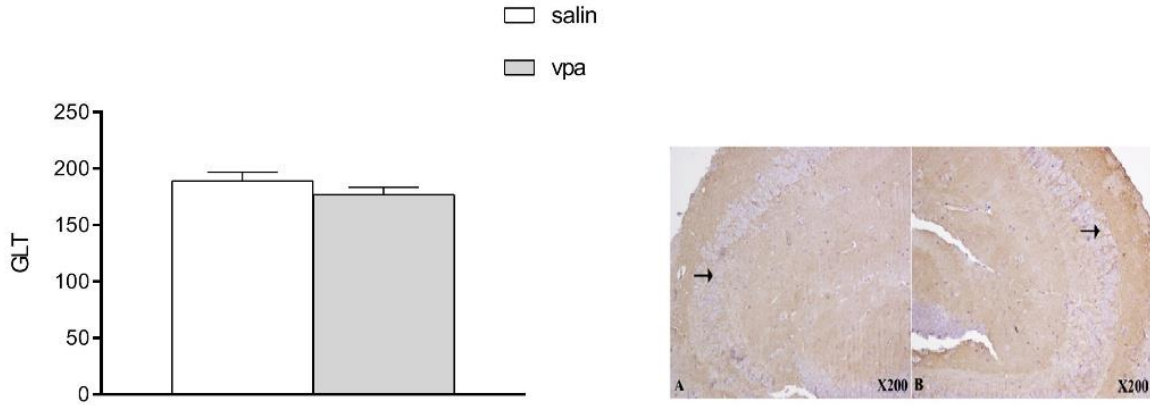
**Şekil 27. Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikor ve hematoxilen zıt boyaması, X200.  $n=8$ , tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Hipokampus CA2 Bölgesi

İntrauterin 12,5. günde VPA ve salin enjeksiyonu yapılan gruplar karşılaştırıldığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2257$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 28).

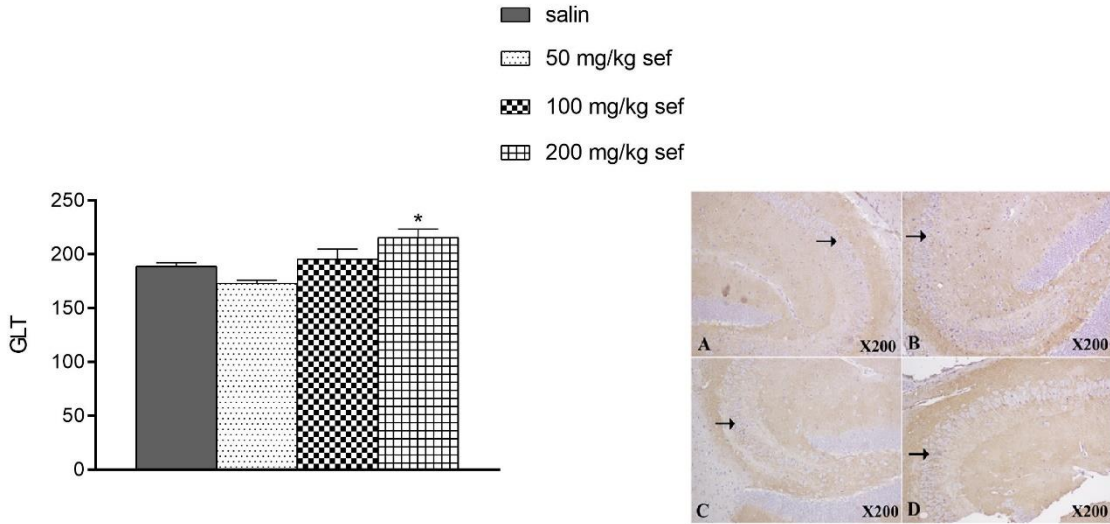




**Şekil 28. Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit uygulanan grup (B). GLT-1 antikor ve hematoksilen zıt boyaması, X200. n=8, eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

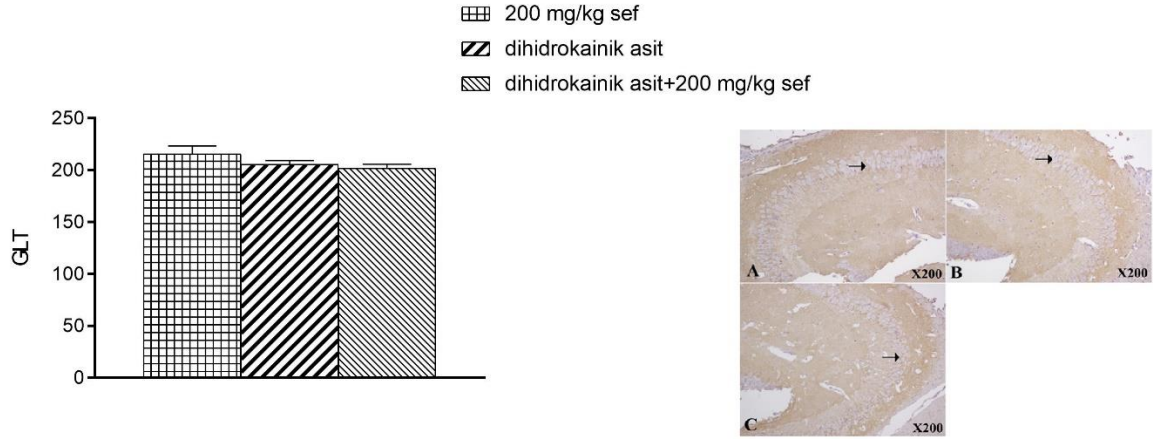
İntrauterin dönemde VPA ve postnatal dönemde seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında sadece seftriakson 200 mg/kg alan grupta kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak daha belirgin bir boyanma vardı ( $p=0,0008$ ; ANOVA) (Şekil 29).



**Şekil 29. Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikor ve hematoksilen zıt boyaması, X200. \* $p<0,01$  vpa+salin grubuna karşı, n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

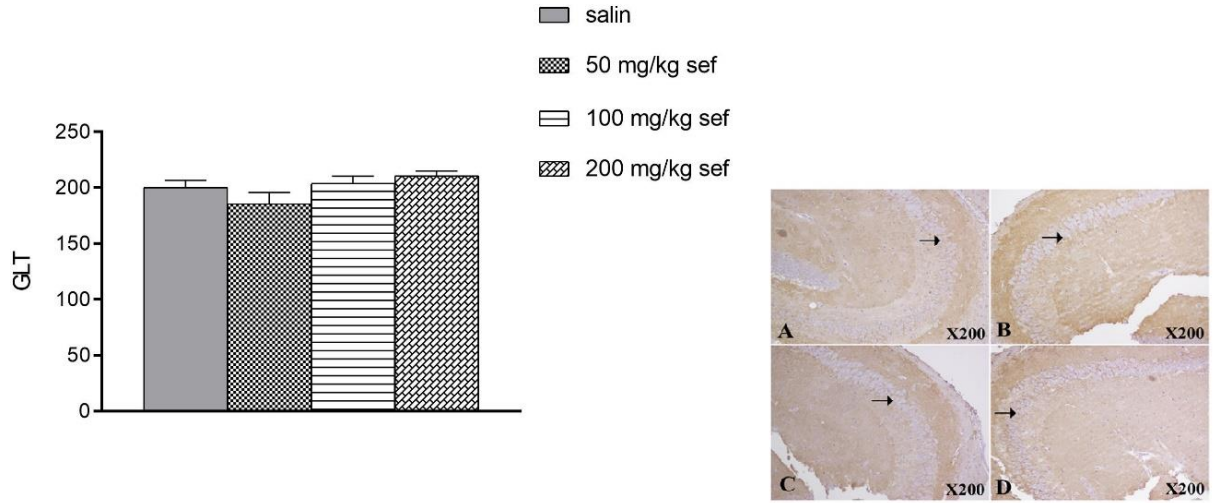
Dihidrokinik asitin etkilerini incelediğimiz gruplarda ise hipokampusun CA2 bölgesindeki boyanmada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2098$ ; ANOVA) (Şekil 30).



**Şekil 30. Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası dihidrokinik asit uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. Günlerarası 200 mg/kg seftriakson ile dihidrokinik asit uygulanan grup (C). GLT-1 antikor ve hematoksilin zıt boyaması, X200. n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

İntrauterin dönemde salın ve postnatal dönemde seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,1139$ ; ANOVA) (Şekil 31).



### Şekil 31. Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).

(G12,5. günde salin ve P47-53. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikoruna ve hematoxilen zıt boyaması, X200. n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

### Hipokampus CA3 Bölgesi

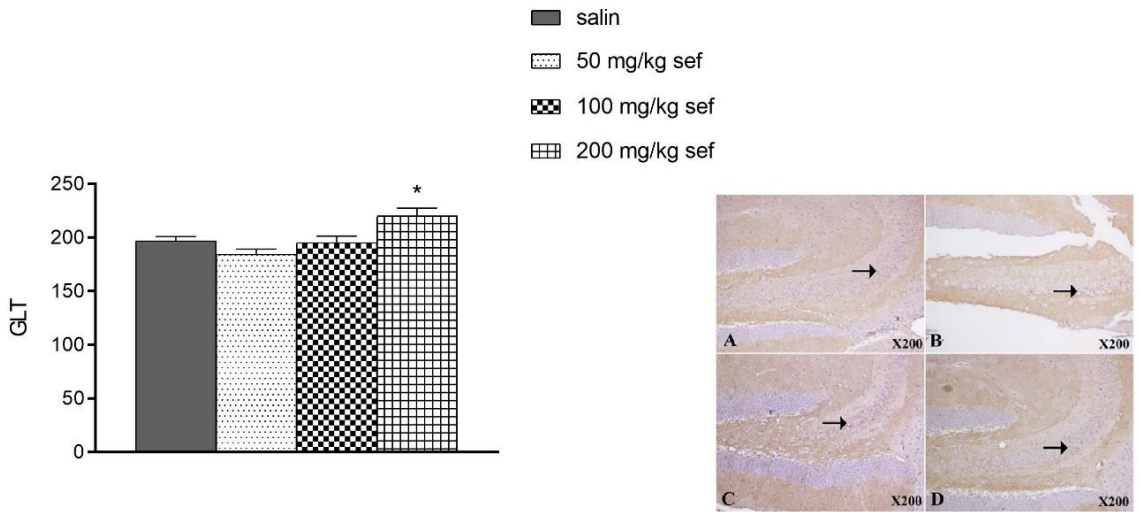
İntrauterin 12,5. günde VPA ve salin enjeksiyonu yapılan gruplar karşılaştırıldığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,3821$ ; eşleştirilmemiş t testi) (Şekil 32).



**Şekil 32. Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit uygulanan grup (B). GLT-1 antikoru ve hematoksilen zıt boyaması, X200. n=8, eşleştirilmemiş t testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

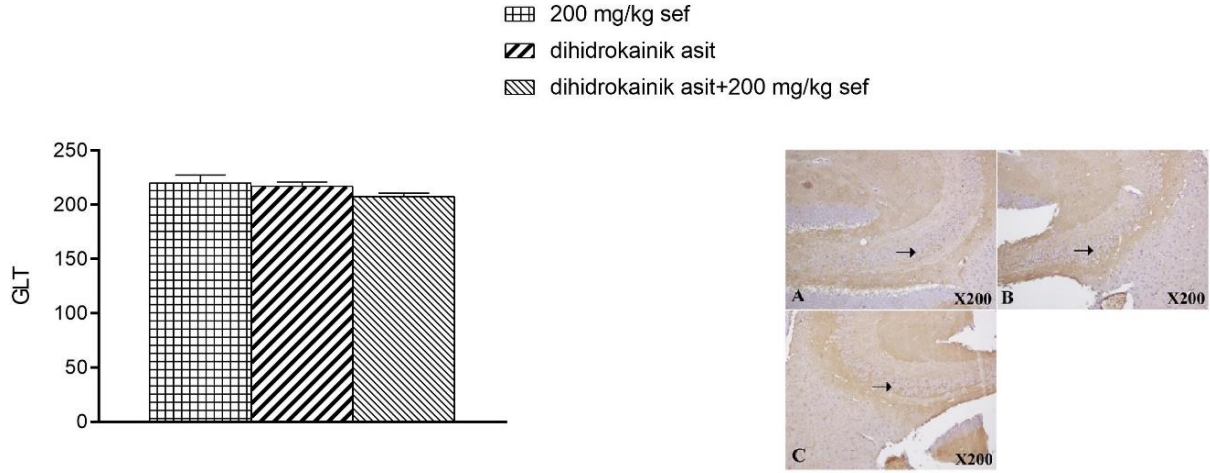
İntrauterin dönemde VPA ve postnatal dönemde seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında sadece seftriakson 200 mg/kg alan grupta kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak daha belirgin bir boyanma vardı ( $p=0,0015$ ; ANOVA) (Şekil 33).



**Şekil 33. Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-53. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikoru ve hematoksilen zıt boyaması, X200. \* $p<0,01$ ; vpa+salin grubuna karşı, n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

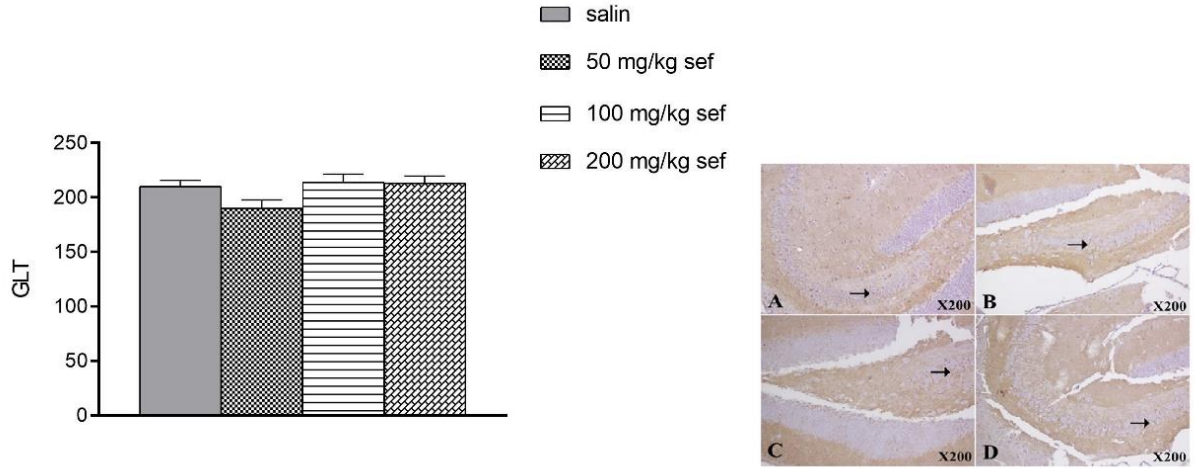
Dihidrokinik asitin etkilerini incelediğimiz gruplarda ise hipokampusun CA3 bölgesindeki boyanmada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,2293$ ; ANOVA) (Şekil 34).



**Şekil 34. Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (A). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası dihidrokinik asit uygulanan grup (B). G12,5. günde 600 mg/kg valproik asit ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson ile dihidrokinik asit uygulanan grup (C). GLT-1 antikor ve hematoxilen zıt boyaması, X200. n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

İntrauterin dönemde salin ve postnatal dönemde seftriakson enjeksiyonu yapılan gruplar kıyaslandığında immunohistokimyasal boyanma açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,1139$ ; ANOVA) (Şekil 35).



**Şekil 35. Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon (oklar).**

(G12,5. günde salin ve P47-53. günler arası salin uygulanan grup (A). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 50 mg/kg seftriakson uygulanan grup (B). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 100 mg/kg seftriakson uygulanan grup (C). G12,5. günde salin ve P47-57. günler arası 200 mg/kg seftriakson uygulanan grup (D). GLT-1 antikorü ve hematoksilen zıt boyaması, X200. n=8, tek yönlü varyans analizi, *post-hoc* Bonferroni testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

## TARTIŞMA

Otizm spektrum bozukluğu günümüzde adını sıkça duyduğumuz, sosyal etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde anormallik, kısıtlı ve yineleyici davranışlarla karakterize, ilgi ve etkinliklerde sınırlılığın görüldüğü nörogelişimsel bir bozukluktur. Tüm bunların yanı sıra, OSB'li bireylerde günlük rutin aktivitelerle aşırı bağlılık, yoğun ilgi odaklanması, günlük rutinde meydana gelen değişikliklere karşı aşırı direnç, stereotipik hareketler, çevreye ve kendine zarar verme ve duyuşal uyarılara karşı olağandışı tepkiler görülmektedir (1).

Otizm normal olarak erkek bireylerde dişilere göre 5 kat daha fazla görülmektedir. Deneysel otizm modelleriyle yapılan çalışmalarda da, her iki cinsin birlikte kullanıldığı çalışmalar (71,72) olmasına rağmen, sadece erkek deneklerin kullanıldığı çalışmaların (10) oldukça fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda gebeliğin 12,5. gününde tek doz VPA enjeksiyonu yapılan annelerden doğan erkek fareler çalışmaya dahil edilmiş ve dişi fareler kullanılmamıştır.

Otizm spektrum bozukluğunun toplumda görölme sıklılığının artması, etiyolojisinin hala belirsiz olması ve günümüzde tedavisinin henüz bulunmaması, birçok araştırmacıyı deneysel hayvan modellerine yönlendirmiştir. Gebelikte meydana gelen çevresel ve kimyasal maruziyetler ve teratojenik ilaç kullanımı otizme sebep olabilmektedir. Prenatal dönemde antiepileptik ilaç olan VPA kullanan insanlardan doğan çocuklarda ve intrauterin dönemde VPA uygulanan hayvanlardan doğan farelerde otistik benzeri davranışlara sebep olan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte (10), prelinik çalışmalar, bu davranışlara;

histon deasetilasyonunun inhibe olmasının, folik asit metabolizmasının bozulmasının ve artan oksidatif stresin sebep olabileceği yönündedir (1).

VPA epigenetik etkilere sahiptir ve bireylerde birçok nöbet tipinde antikonvülzan etki göstermektedir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, valproatın antikonvülzan etkiyi iki şekilde yaptığını öne sürmüştür. İlki, valproatın beyin ve plazmadaki konsantrasyonuna bağlı direkt farmakolojik etkisiyken, diğeri; beyinde bulunan nörotransmitter konsantrasyonlarındaki değişime, hücre membranı üzerindeki doğrudan etkilerine ya da valproatın metabolitlerine bağlı olan dolaylı etkisidir. Bu durum beyinde artan GABA konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (73).

Yapılan birçok çalışma incelendiğinde, OSB'ye sahip bireylerde GABA ve glutamat gibi birçok nörotransmitterde anormalliğin söz konusu olduğu görülmüş, meydana gelen anormallik OSB patogenezi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir (56). Otizmlili bireylerde normal bireylere oranla plazmada GABA konsantrasyonu yüksek ve glutamat/GABA oranı düşük bulunmuştur (59). Bunun aksine, başka çalışmalarda otistik bireylerde frontal lobda yapılan görüntülemelerde GABA ve GABA/glutamat oranlarında düşme olduğu gösterilmiştir (6).

Günümüzde otizmin glutamatla ilişkisini açıklamaya çalışan iki teori bulunmaktadır. Bunlardan birincisi 1998 yılında Carlsson tarafından ortaya atılan otizmin hipoglutamaterjik bir hastalık olduğuna yönelik teoridir. Carlsson bu teorisini NMDA antagonisti uygulanan sağlıklı deneklerde otizm benzeri semptomların görülmesine ve otizmde beyin glutamattan zengin nöronların bulunduğu beyin bölgelerinde hasar tespit edilmiş olmasına bağlamıştır (74). Diğer teori ise 2006 yılında Fatemi tarafından ortaya konan otizmin hiperglutamaterjik bir hastalık olduğuna yönelik hipotezidir (75). Fatemi teorisini üç bulgu ile açıklamaya çalışmıştır. Bunlardan birincisi Shinohe ve arkadaşlarının (76) yaptıkları çalışmada otizmlili bireylerde serum glutamat düzeyinin normal bireylere göre yüksek olmasıdır (75). Sebeplerden bir diğeri Fatemi ve ekibinin (75) glutamatın yıkımında görevli olan glutamik asit dekarboksilaz enziminin otistik bireylerin beyin dokularında azalmış olduğunu göstermeleridir. Bu bulgu daha sonra Yip ve arkadaşları (77) tarafından da desteklenmiştir. Hiperglutamaterjik teorisinin en son destekleyicilerinden biri de otistik bireylerin beyin dokularında gliosisin göstergesi olan glial fibriller asidik protein'in (GFAP) yüksek bulunmasıdır. Bu bulgu astroglial ve mikroglial aktivasyonun bir göstergesidir. Astrogliallar hem ekstrasellüler alandan glutamata alır hem de glutaminden glutamat sentezlerler (75,78,79).



Glutamat konsantrasyonunun düzenlenmesinde kilit rol oynayan, glutamat taşıyıcılarından biri olan GLT-1'in miktarında ve fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların da otizme sebep olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (62). Son dönemde yapılan çalışmalar beta laktam antibiyotiklerden olan seftriaksonun kronik kullanımının doza bağlı olarak GLT-1'in ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (63). Seftriaksonun GLT-1 ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkisi daha önce anabilim dalımızda yapılmış çalışmada da gösterilmiştir (70).

Bu bilgiler varlığında biz de çalışmamızda otizmin hiperglutamaterjik bir hastalık olduğu hipotezine dayanarak, seftriakson aracılığı ile GLT-1 ekspresyonunu artırıp sinaptik aralıktaki glutamati azaltmayı ve yüksek glutamat seviyelerinin neden olduğu bulguların azalmasını göstermeyi amaçladık. Ancak otizm modeli olarak VPA ile oluşturulan otizm modelini seçmemiz çalışmamızı karmaşıktır. Çünkü yapılan çalışmalarda VPA'nın astrosit ve oligodentrositlerde EATT'lerin hem mRNA hem de proteinlerinin miktarını artırdığını göstermektedir. VPA bu etkisini histon deasetilaz enziminin inhibisyonu ile oluşturmaktadır ve sadece GLT-1'in değil diğer glutamat taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunu da epigenetik etkileri ile artırmaktadır (80). Ayrıca VPA, GLT-1 ekspresyonunun düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. VPA GLT-1 ekspresyonunu hipokampus ve kortekste artırırken serebellumda azaltmaktadır (81). GLT-1 miktarındaki artış, çalışmamızda hem sadece 12,5. günde VPA alan hem de 12,5. gündeki VPA'ya ek olarak postnatal dönemde salınan grupta, kontrol gruplarına kıyasla western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Postnatal dönemde kronik uygulanan seftriaksonun doza bağlı GLT-1 ekspresyonunu artırıcı etkisi VPA alan gruplarda görülmedi. Bu durum, GLT-1 miktarındaki artışın zaten VPA ile başlangıçta yüksek olmasına ve daha fazla artmamasına bağlanabilir; çünkü gebelik döneminde salınan enjeksiyonu yapılan gruplarda postnatal uygulanan seftriaksonun 200 mg/kg dozda GLT-1 artışına sebep olduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

Çalışmamızın davranış bulgularını değerlendirmemiz gerekirse, üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde VPA alan grupta hem deneyin birinci bölümünde hem de ikinci bölümünde deneğin sosyalleşmesinde ve sosyal yeniliğe uyumunda azalma vardı. Bu bulgu modelin olduğu ve otizm benzeri davranışların ortaya çıktığı yönünde yorumlanabilir. Bu gruplarda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süre açısından anlamlı bir fark yoktu. Bu bulgu hayvanların anksiyetelerinin artmadığı yönünde yorumlanabilir. Park ve arkadaşlarının (82) *Slit3* geni eksik fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, farelerin yükseltilmiş artı labirent test düzeneği üzerinde açık kollarda daha az vakit geçirmiş

olduklarını gözlemlemiş ve bu durumu artan anksiyete ile ilişkilendirmişlerdir. Yine Mirza ve ark. (83) yaptıkları çalışmada, otistik sıçanların test düzeneğinin açık kollarında zaman geçirmediğini gözlemlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında, yukarıda belirtilen iki çalışmanın aksine çalışmamızda otistik kabul ettiğimiz farelerin anksiyete göstermemeleri nedeniyle ortaya çıkan uyumsuzluğun, birinci çalışmada kullanılan farelerin genetik olarak modifiye edilmiş hayvanlar olmasından ve ikinci çalışmada ise farklı türde hayvan kullanılmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Ağrıya duyarlılığın değerlendirildiği *hot plate* testinde, VPA uygulanan grubun, salin uygulanan gruba kıyasla, sıcak plakadan ayaklarını istatistiksel olarak anlamlı derecede erken çektikleri görüldü. Oysaki Schneider ve Przewlocki (54) yaptıkları çalışmada intrauterin 12,5. günde 600 mg/kg dozda VPA uygulanan Wistar türü sıçanların ağrıya karşı duyarlılıklarının azaldığını ve sosyal keşif sayı ve faaliyetlerinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Bununla beraber Markram ve ark. (55) yaptıkları çalışmada ise, Wistar cinsi sıçanlara intrauterin 12,5. günde 500 mg/kg dozda VPA uygulamışlar ve deneklerin sosyal etkileşimden kaçındıkları, sosyal keşiflerinde ve termal ağrıya karşı duyarlılıklarında azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda sıcak plakadan ayaklarını geç çekmeleri beklenen VPA uygulanan grupta literatürden farklı sonuçlar bulmamız hem hayvan türündeki farklılığa hem de deneyin uygulandığı gün olan 56. günde hayvanların pençelerinin yeterince kalınlaşmamasına bağlanabilir. Çünkü intrauterin dönemde VPA enjeksiyonu yapılan grupların ağırlıkları kontrol gruplarına göre belirgin derecede azdı.

VPA ile oluşturulan deneysel otizm modellerinde ekseriyetle, insanlarda görülen otizmde karakterize olan tekrarlı davranışlar, sosyal etkileşim ve sosyal yenilikte azalma, lokomotor aktivitede bozulma, acı ve ağrıya duyarsızlık ve anksiyetede artış görüldüğü birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (8,84,85). Çalışmamızda anksiyete düzeyi ve hayvanların araştırmacı davranışlarının incelendiği bir diğer test olan açık alan testinde VPA uygulanan grubun araştırmacı davranışlar sergilemediği görüldü. Yapılan çalışmalarda, VPA kaynaklı otizm modellerinde yineleyici ve kalıplaşmış davranışların arttığı gösterilmiştir (54). Yine yapılan çalışmalarda, VPA uygulanan farelerin, hiperaktivitelerinin artmış olduğu açık alan testi ile gösterilmiştir (86). VPA uygulanan farelerde *rearing* süresinin az olmasını, anksiyetenin artmış olmasından kaynaklı, farelerin test düzeneğinde ortamı tanıma yerine hareketsiz kalmayı tercih etmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. ICR (CD1) cinsi fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, intrauterin 12,5. günde 500 mg/kg dozda VPA uygulanmış

farelerin sosyal etkileşimlerinin, lokomotor aktivitelerinin, keşif aktivitelerinin azaldığı, anksiyetelerinin ise arttığı görülmüştür (8).

Çalışmamızda seftriaksonun otizm üzerindeki etkisini incelemeyi amaçlamıştık. Bu sebeple intrauterin dönemde 12,5. günde VPA (600 mg/kg) uygulanan annelerden doğan erkek farelere, kontrol grubu salin olmak üzere, seftriakson 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda uygulandı. Deneklerin sosyallik ve sosyal yeniliğini değerlendirmek adına, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubu ve farklı dozlarda seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanan gruplar arasında, boş kafes ve dolu kafes bölmelerinde geçirilen süre bakımından anlamlı fark yoktu. Boş kafes ve dolu kafesi koklama açısından da sadece 50 mg/kg seftriakson uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı, ancak deneyin geneline bakıldığında bu fark anlamlı kabul edilmedi. Yine söz konusu grupların, yabancı ve tanıdık farelerin yer aldığı bölmelerde geçirdikleri süreler ile, yabancı ve tanıdık fareleri koklama süreleri kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmedi. Bahsi geçen gruplar için, yükseltilmiş artı labirent testi, hot plate testi, açık alan testi verileri arasında da kontrol grubuna kıyasla seftriakson uygulanan gruplarda anlamlı fark görülmemiştir. Yaptığımız literatür taramasında otistik hayvanlar üzerinde yapılmış ve seftriaksonun etkilerini inceleyen bir çalışma göremedik, ancak seftriakson tedavisinin otistik bir çocukta agresif davranışları azalttığı yönünde bir olgu sunumuna rastladık. Zaten bu olgu sunumu bu çalışmaya yola çıkarken temel aldığımız çalışmalardan biriydi (87).

Çalışmamızda seftriaksonun etkisini GLT-1 üzerinden yapıp yapmadığını anlayabilmemiz için, GLT-1 taşıyıcı inhibitörü olan dihidrokainik asit uygulandı. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde tek başına dihidrokainik asit alan grup ile dihidrokainik asit+seftriakson (200 mg/kg) alan grupta hem deneyin birinci bölümünde hem ikinci bölümünde deneğin sosyalleşmesinde ve sosyal yeniliğe uyumunda artış vardı. Söz konusu gruplar için, yükseltilmiş artı labirent testi, *hot plate* testi, açık alan testi verileri arasında da kontrol grubuna kıyasla dihidrokainik asit uygulanan gruplarda anlamlı fark görülmemiştir. John ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda amigdalaya dihidrokainik asit yapılmasının anksiyete ve depresif davranışları indüklediklerini göstermişlerdir (88). Normal hayvanlar üzerinde yapılan bu çalışma bulunmasına rağmen otistik hayvanlar üzerinde dihidrokainik asitin etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Seftriaksonun kronik kullanımının intrauterin dönemde salin enjeksiyonu yapılan gruplar üzerindeki etkisini incelediğimiz gruplarda üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin

sosyalleşme aşamasında deneklerin boş kafesi koklama sürelerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma olduğu görüldü. Bu bulgu seftriaksonun deneklerin sosyalleşmesini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak üç odalı testin ikinci bölümünde ve diğer davranış deneylerinde seftriaksonun bir etkisi görülmedi. Oysa Ocasio ve ark. (89) yaptıkları çalışmada, sıçanlara kronik olarak seftriakson (200 mg/kg) uygulamışlar ve deneklerin açık alan test düzeneğinin duvarlara yakın bölümünde, düzeneğin merkezine kıyasla daha az zaman geçirdikleri, dolayısıyla daha az anksiyeteye sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. Şavlı'nın yaptığı bir çalışmada ise akut olarak artan dozlarda seftriakson uygulanmasının (50, 100, 200 mg/kg) anksiyolitik etki oluşturmak için yeterli olmadığı gösterilmiştir (90). Çalışmamızla literatürler arasında gözlemlenen bu farklılıkların, çalışmamızda kullanılan fare ırkına, seftriaksonun uygulanma süresi gibi farklılıklara bağlanabilir.

Çalışmamızda GLT-1 ekspresyonu hem western blotting hem de immunohistokimyasal inceleme ile araştırıldı. Western blot ile yapılan incelemelerde hem sadece intrauterin 12,5 günde VPA uygulanan hem de intrauterin 12,5 günde VPA ve postnatal dönemde salin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde GLT-1 ekspresyonunda artış vardı. Yaptığımız literatür taramasında VPA'nın epigenetik etkilerine bağlı olarak GLT-1 ekspresyonunu artırdığını gördük. Ancak intrauterin dönemde uygulanan tek doz VPA'nın postnatal dönemde GLT-1 ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Bu özelliği ile çalışmamız intrauterin dönemde uygulanan VPA'nın GLT-1 ekspresyonu üzerindeki artırıcı etkisinin postnatal dönemde de devam ettiğini gösteren farklı bir çalışmadır. Ancak bu artışı immunohistokimyasal incelemede ortaya koyamadık. İntrauterin VPA alan gruplarda seftriaksonun etkisini incelediğimizde western blotta gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktu, ancak immunohistokimyasal incelemede 200 mg/kg seftriakson alan gruplarda kontrol grubuna kıyasla GLT-1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardı. İntrauterin dönemde salin uygulanan gruplarda seftriaksonun etkisini incelediğimiz gruplarda western blotting ile yapılan incelemede 200 mg/kg alan grupta istatistiksel olarak anlamlı artış vardı, ancak bu artış immunohistokimyasal yöntem ile gösterilemedi. Dihidrokinik asit ise tek başına uygulanan grupta hem 200 mg/kg seftriakson grubuna kıyasla hem de seftriakson ve dihidrokainik asitin birlikte uygulandığı gruba kıyasla GLT-1 ekspresyonunu azalttı. Dihidrokinik asit normalde GLT-1 inhibitörüdür, ancak GLT-1'in ekspresyonunu düzenleyici bir etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç acaba dihidrokainik asit sadece sinaptik membran üzerindeki GLT-1'i inhibe etmeyip, GLT-1'in ekspresyonunu da mı azaltıyor sorusunu akla getirmektedir. Ancak bu sorunun

cevaplanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kesindir. Çalışmamızın tümüne baktığımızda western blot ve immunohistokimyasal inceleme sonuçlarının birbiri ile korele olmadığı dikkat çekmektedir. İki incelemenin arasındaki fark örnek alınma yöntemleri arasındaki farka bağlı olabilir. Western blotting için punch biyopsi yapılarak hipokampüsten rastgele örnek alınmıştı, ancak immunohistokimyasal inceleme hipokampüsün farklı bölgelerinde ayrı ayrı değerlendirildi. Buna ek olarak her grupta yer alan sekizer hayvanın dördünün sağ diğer dördünün ise sol hemisferleri western blot ve immunohistokimya için ayrıldı. Sonuçlar arasındaki farklılık belki de otizmde sağ ve sol hemisferlerde farklılıklar olmasına bağlı olabilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda serebral hemisferlerde hipokampüsün bütün olarak çıkarılmasının ve hep aynı hemisferde inceleme yapılmasının sonuçların daha güvenilir olmasını sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızdaki sonuçları bir bütün olarak değerlendirmemiz gerekirse iki teori üretebiliriz. Bunlardan birincisi intrauterin dönemde VPA enjeksiyonu yapılması otizm benzeri davranışlara yol açıyorsa ve bu etki GLT-1 ekspresyonundaki artışa bağlıysa otizm hipoglutamaterjik bir hastalık olarak yorumlanabilir. Çünkü artan GLT-1 sinaptik aralıktaki glutamat miktarının azalmasına sebep olacaktır. Ancak burada akla getirilmesi gereken soru intrauterin dönemde bir kez maruz kalınan VPA'nın etkisinin bu kadar uzun süre devam edip etmeyeceğidir. İkinci teori ise otizm hiperglutamaterjik bir hastalık olması ve GLT-1 ekspresyonunun kompensasyon mekanizması olarak artmasıdır. Eğer otizm hiperglutamaterjik bir hastalıksa seftriakson gibi GLT-1 ekspresyonunu artıran ilaçlar otizm tedavisi için bir umut olabilir. Ancak bu teorilerin desteklenmesi için farklı otizm modelleri üzerinde yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda; gebeliğin 12,5. gününde VPA ya da salin enjeksiyonu yapılan gebe farelerden doğan erkek farelerde, kronik seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) uygulanmasının otizm üzerindeki etkisi incelendi. Doğan fareler 54 günlük olduğunda, seftriaksonun davranış deneylerine etkisini incelemek üzere sırasıyla, rotarod, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, yükseltilmiş artı labirent testi, hot plate testi ve açık alan testi uygulandı. Hipokampüste GLT-1 ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için ise immunohistokimyasal yöntem ve western blotting kullanıldı.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri dört bölümde inceleyecek olursak;

Davranış deneyleri ve GLT-1 ekspresyonu üzerine VPA'nın etkisi;

1- Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde VPA uygulanan grubun salin uygulanan gruba göre dolu kafesin olduğu bölümde geçirdiği süre ile yabancı fareyi koklama süresi daha kısaydı ( $p<0,05$ ).

2- Yükseltilmiş artı labirent testinde VPA uygulanan grubun toplam gezilen mesafesi salin grubuna göre daha fazlaydı ( $p<0,05$ ).

3- Hot plate testinde VPA uygulanan grubun pençe çekme süresi salin grubuna göre daha kısaydı ( $p<0,05$ ).

4- Açık alan testinde VPA uygulanan grubun arka ayakları üzerinde durma süresi salin grubuna göre daha kısaydı ( $p<0,05$ ).

5- Western blotting analizinde VPA uygulanan gruplarda GLT-1/B-aktin oranı salin grubuna göre oldukça fazlaydı ( $p<0,01$ ).

6- İmmunohistokimya analizinde VPA uygulanan grubun, hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki immunreaktivitesi salin uygulanan gruba benzerdi.

G12,5. günde VPA uygulanan gruplarda farklı dozlarda uygulanan seftriaksonun etkisi;

1- Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde seftriakson uygulanan grupların kontrol grubuna göre dolu kafesin olduğu bölümde geçirdiği süre ile yabancı fareyi koklama süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

2- Yükseltmiş artı labirent testi, açık alan testi ve hot plate testlerinde seftriakson uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $p>0,05$ ).

3- Western blotting analizinde seftriakson uygulanan gruplarda GLT-1/B-aktin oranı kontrol grubu arasında fark yoktu ancak immunohistokimya analizinde 200 mg/kg seftriakson uygulanan grubun, hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki immunreaktivitesi kontrol grubuna göre fazlaydı ( $p<0,01$ ).

G12,5. günde VPA uygulanan gruplarda dihidrokainik asit etkisi;

1- Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde dihidrokainik asit hem tek başına hem de seftriaksonla birlikte uygulandığında, boş kafesi de dolu kafesi de koklama süreleri kontrol grubuna kıyasla daha azdı ( $p<0,05$ ).

2- Dihidrokinik asitin tek başına veya seftriaksonla birlikte uygulanması yükseltmiş artı labirent, açık alan ve hot plate testlerinde kontrol grubuna göre bir fark oluşturmadı.

3- Western blotting analizinde tek başına dihidrokainik asit uygulanan grupta GLT-1/B-aktin oranı kontrol grubuna göre daha azdı ( $p<0,01$ ).

4- İmmunohistokimya analizinde kontrol grubunun, dihidrokainik asitin tek başına ve seftriaksonla birlikte uygulanan gruba kıyasla hipokampus sadece CA1 bölgesinde immunreaktivitesi fazlaydı ( $p<0,05$ ), hipokampus CA2 ve CA3 bölgelerinde ise fark yoktu.

G12,5. günde salin uygulanan gruplarda farklı dozlarda uygulanan seftriaksonun etkisi;

1- Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde seftriakson uygulanan grupların deneyin ilk bölümünde boş kafesi koklama süreleri kontrol grubuna göre daha azdı ( $p<0,05$ ).

2- Yükseltmiş artı labirent ve hot plate testinde seftriakson uygulanan gruplar ile kontrol grupları arasında bir fark yoktu.

3- Açık alan testinde seftriakson uygulanan grupların merkezde geçirilen süre bakımından kontrol grubu ile fark yokken 100 mg/kg seftriakson uygulanan grubun *rearing* süresi kontrol grubuna göre azdı ( $p<0,05$ ).

4- Western blotting analizinde 200 mg/kg seftriakson uygulanan grubun GLT-1/B-aktin oranı kontrol grubuna göre daha fazlaydı ( $p<0,001$ ).

5- İmmunohistokimya analizinde seftriakson uygulanan grubun, hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki immunreaktivitesi kontrol grubu ile benzerdi.

Çalışmamızda yer alan tüm grupların rotarod testi verileri arasında herhangi bir fark görülmedi.





## ÖZET

Çalışmamızda, gebeliğin 12,5. gününde valproik asit uygulanan dişi farelerden doğan erkek farelere, postnatal dönemde farklı dozlarda seftriakson uygulanmasının etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

96 adet Balb/c cinsi erkek fare, her grupta 8 adet hayvan bulunacak şekilde, 12 gruba ayrıldı. G12,5. günde VPA/salin uygulanan gebe farelerden doğan erkek yavru farelere, 47-57. günler arası seftriakson (50, 100, 200 mg/kg) ya da salin uygulandı. Seftriaksonun etkisinin GLT-1 üzerinden olup olmadığının incelendiği gruplarda deneklere 10 mg/kg dihidrokainik asit intraperitoneal yolla uygulandı. Çalışmadaki tüm gruplara 54-57. günler arası sırasıyla, *rotarod*, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, yükseltilmiş artı labirent testi, *hot plate* ve açık alan testleri uygulandı. Davranış deneyleri tamamlandıktan sonra alınan beyin dokularından hipokampüste GLT-1 düzeyleri immunohistokimyasal yöntem ve western blotting ile ölçüldü.

Çalışmamızda intrauterin dönemde VPA uygulanan grupta otizm benzeri davranışlar görülmüştür. Kronik ve artan dozlarda seftriakson uygulanmasının otizmde görülen davranış bozuklukları üzerinde iyileştirici bir etkisi bulunmamıştır.

Sonuçlarımız seftriaksonun valproik asit kaynaklı otizm üzerinde tedavi edici etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Otizm spektrum bozukluğu, valproik asit, seftriakson, glt-1

## **THE EFFECT OF CEFTRIAXONE IN THE VALPROIC ACID-INDUCED AUTISM MODEL**

### **SUMMARY**

In our study we aimed to investigate the effects of different doses of ceftriaxone in postnatal period in male mice exposed to valproic acid at 12,5th day of the pregnancy.

A total of 96 Balb/c male mice were divided into 12 groups (n=8 animals for group). Ceftriaxone (50, 100, 200 mg/kg/day) or saline was administered the male offsprings born from pregnant mice administered VPA/saline, between days 47-57. 10 mg / kg dihydrokainic acid was administered intraperitoneally to evaluate whether GLT-1 mediates the effect of ceftriaxone. Rota rod, 3 chamber sociality and social interaction test, elevated plus maze test, hot plate and open field tests were performed in all groups on days 54-57. GLT-1 levels in the hippocampus were measured by immunohistochemical method and western blotting.

In our study, autism-like behaviors were observed in male offsprings that were exposed VPA in the intrauterine period. Chronic and increased doses of ceftriaxone did not exert a curative effect on behavioral impairment seen in autism.

Our results show that ceftriaxone has no therapeutic effect on valproic acid-induced autism.

**Keywords:** autism spectrum disorders, valproic acid, ceftriaxone, glt-1

## KAYNAKLAR

1. de Theije CG, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, et al. Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 2014;37:240-7.
2. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23(4):236-41.
3. Pizzarelli R, Cherubini E. Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural Plast* 2011;2011:297153.
4. Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 2002;3(9):715-27.
5. Abu Shmais GA, Al-Ayadhi LY, Al-Dbass AM, El-Ansary AK. Mechanism of nitrogen metabolism-related parameters and enzyme activities in the pathophysiology of autism. *J Neurodev Disord* 2012;4(1):4.
6. Harada M, Taki MM, Nose A, Kubo H, Mori K, Nishitani H, et al. Non-invasive evaluation of the GABAergic/glutamatergic system in autistic patients observed by MEGA-editing proton MR spectroscopy using a clinical 3 tesla instrument. *J Autism Dev Disord* 2011;41(4):447-54.
7. Chen VS, Morrison JP, Southwell MF, Foley JF, Bolon B, Elmore SA. Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5. *Toxicol Pathol* 2017;45(6):705-44.

8. 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.
9. Gabriels RL, Hill DÍ DEH. Autism: from research to individualized practice. In: Publishers JK, editor. 2002.
10. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol* 2018;299(Pt A):217-27.
11. Autism Spectrum Disorder. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (son erişim tarihi: Ocak 2019), <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/treatment.html>
12. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2018;67(6):1-23.
13. Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet* 2014;383(9920):896-910.
14. Community Report on Autism 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (son erişim tarihi: Eylül 2018), [https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/states/comm\\_report\\_autism\\_2014.pdf](https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/states/comm_report_autism_2014.pdf)
15. Doğangün UDB. Özel eğitim gerektiren psikiyatrik durumlar. Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi,2008,62:157-174
16. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68(11):1095-102.
17. Bozdoğan ST, Kutuk MO, Tufan E, Altintas Z, Temel GO, Toros F. No association between polymorphisms of vitamin D and oxytocin receptor genes and autistic spectrum disorder in a sample of turkish children. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2018;16(4):415-21.
18. Şener EF, Özkul Y. Otizmin genetik temelleri. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 2013;22(1):86-92.
19. Trevathan E. Seizures and epilepsy among children with language regression and autistic spectrum disorders. *J Child Neurol* 2004;19 Suppl 1S49-57.

20. Gillberg C, Gillberg C, Rastam M, Wentz E. The asperger syndrome (and high-functioning autism) diagnostic interview (ASDI): a preliminary study of a new structured clinical interview. *Autism* 2001;5(1):57-66.
21. Yosunkaya E. Otizm etyolojisinde genetik ve güncel perspektif. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2013;76(4):84-8.
22. Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *Jama* 2001;285(24):3093-9.
23. Kleinman JM, Ventola PE, Pandey J, Verbalis AD, Barton M, Hodgson S, et al. Diagnostic stability in very young children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2008;38(4):606-15.
24. 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.
25. Bolton PF, Golding J, Emond A, Steer CD. Autism spectrum disorder and autistic traits in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children: precursors and early signs. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2012;51(3):249-60.e25.
26. Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders FE. American Psychiatric Association, Fifth Edition.
27. Özeren GS. Otizm spektrum bozukluğu (OSB) ve hastalığa kanıt penceresinden bakış. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2013;4(2):57-63.
28. Greenspan SI. Reconsidering the diagnosis and treatment of very young children with autistic spectrum or pervasive developmental disorder. *Zero to Three* 1992;13(2):1-9.
29. Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, Cook EH, Jr., Dawson G, Gordon B, et al. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 1999;29(6):439-84.
30. Korkmaz B, 2000a. Yağmur çocuklar, otizm nedir? İstanbul: 2. Baskı, Doğan Kitapçılık, 166 s.
31. İftar ET. Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklar ve eğitimleri. Ankara: Ayrıntı Basımevi, 2012.
32. Önal S, Uçar A. Otizm spektrum bozukluğu tedavisinde beslenme yaklaşımları. *Ankara Sağlık Bilimleri Dergisi* 2017;(1-2-3):179-194

33. Parker-Athill EC, Tan J. Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. *Neurosignals* 2010;18(2):113-28.
34. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol* 2015;56:155-69.
35. Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Tourlet S, Guilloteau D, Chalon S, Andres CR, et al. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35(5):1254-65.
36. Lord C, Cook EH, Leventhal BL, Amaral DG. Autism spectrum disorders. *Neuron* 2000;28(2):355-63.
37. Aylward EH, Minshew NJ, Goldstein G, Honeycutt NA, Augustine AM, Yates KO, et al. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 1999;53(9):2145-50.
38. Chawarska K, Shic F. Looking but not seeing: atypical visual scanning and recognition of faces in 2 and 4-year-old children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2009;39(12):1663-72.
39. Özer E, Özdemir S. Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Çocuklarda Yüz İşleme ve Göz İzleme Becerileri. *International Journal of Early Childhood Special Education (INT-JECSE)* 2015;7(1):01-23.
40. Dalton KM, Nacewicz BM, Johnstone T, Schaefer HS, Gernsbacher MA, Goldsmith HH, et al. Gaze fixation and the neural circuitry of face processing in autism. *Nat Neurosci* 2005;8(4):519-26.
41. Sears LL, Vest C, Mohamed S, Bailey J, Ranson BJ, Piven J. An MRI study of the basal ganglia in autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23(4):613-24.
42. Kemper TL, Bauman ML. Neuropathology of infantile autism. *Mol Psychiatry* 2002;7 Suppl 2S12-3.
43. Bailey A., Phillips W., Rutter M. Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives, *J. Child Psychol. Psychiatr.*,1996;37:89-126.

44. Ulay HT, Ertuğrul A. Neuroimaging findings in autism: a brief review. *Türk Psikiyatri Derg* 2009;20(2):164-74.
45. Courchesne E, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology* 2001;57(2):245-54.
46. Autism Spectrum Disorder. Mental Health Information. (son erişim tarihi: Eylül 2018), <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/autism-spectrum-disorders-asd/index.shtml>
47. Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, Almeida HC, Costa AE. Autism and mobius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(2a):181-5.
48. Spagnolo A. Teratogenesis of alcohol. *Ann Ist Super Sanita* 1993;29(1):89-96.
49. Kelly SJ, Day N, Streissguth AP. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22(2):143-9.
50. Choi TY, Lee SH, Kim SJ, Jo Y, Park CS, Choi SY. BK channel blocker paxilline attenuates thalidomide-caused synaptic and cognitive dysfunctions in mice. *Sci Rep* 2018;8(1):17653.
51. Loscher 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.
52. Williams EL, Casanova MF. Above genetics: lessons from cerebral development in autism. *Transl Neurosci* 2011;2(2):106-20.
53. 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.
54. Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(1):80-9.
55. 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.

56. Wang B, Li HH, Yue XJ, Jia FY, Du L. A review on the role of gamma-aminobutyric acid signaling pathway in autism spectrum disorder. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2018;20(11):974-8.
57. Cellot G, Cherubini E. GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2014;270.
58. Robertson CE, Ratai EM, Kanwisher N. Reduced GABAergic action in the autistic brain. *Curr Biol* 2016;26(1):80-5.
59. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation* 2014;11189.
60. Seal RP, Amara SG. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:431-56.
61. Yang Z, Wang J, Yu C, Xu P, Zhang J, Peng Y, et al. Inhibition of p38 MAPK signaling regulates the expression of EAAT2 in the brains of epileptic rats. *Front Neurol* 2018;9:925.
62. Mei YY, Wu DC, Zhou N. Astrocytic regulation of glutamate transmission in schizophrenia. *Front Psychiatry* 2018;9:544.
63. Yan H, Li CM, Li YL, Gong ZH. Effect of spinal glutamate transporter 1 on chronic constriction injury of sciatic nerve and morphine tolerance of rats. *Yao Xue Xue Bao* 2009;44(6):581-5.
64. Fan S, Xian X, Li L, Yao X, Hu Y, Zhang M, et al. Ceftriaxone improves cognitive function and upregulates GLT-1-related glutamate-glutamine cycle in APP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 2018;66(4):1731-43.
65. Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc* 1997;2(1):75-84.
66. Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of parkinsonism. *J Neurosci Methods* 1998;83(2):165-75.
67. Küçük A, Gölgeli A. Deney hayvanlarında anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 2005;14(3):209-217.



68. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14(3):149-67.
69. Md Al Amin, Chowdhury IA, Mahbub KMM, Sattar M, Shahriar M, Kuddus MdR, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of *asteracantha longifolia* nees. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* 2012;15(2):171-176.
70. Karaman I, Kizilay-Ozfidan G, Karadag CH, Ulugol A. Lack of effect of ceftriaxone, a GLT-1 transporter activator, on spatial memory in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;10861-5.
71. Acosta J, Campolongo MA, Hocht C, Depino AM, Golombek DA, Agostino PV. Deficits in temporal processing in mice prenatally exposed to Valproic Acid. *Eur J Neurosci* 2018;47(6):619-30.
72. 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.
73. Sanofi Aventis İlaçları Ltd. Şti. Depakin 400 mg/4 ml i.v. Enjeksiyonluk Çözelti Hazırlamak İçin Liyofilize Toz İçeren Flakon Kullanma Talimatı.
74. Carlsson ML. Hypothesis: is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate - serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm (Vienna)* 1998;105(4-5):525-35.
75. Fatemi SH, Halt AR, Sary JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* 2002;52(8):805-10.
76. Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, et al. Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30(8):1472-7.
77. Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta Neuropathol* 2007;113(5):559-68.
78. Laurence JA, Fatemi SH. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum* 2005;4(3):206-10.

79. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 2007;85(15):3347-58.
80. Martinez-Lozada Z, Guillem AM, Robinson MB. Transcriptional regulation of glutamate transporters: from extracellular signals to transcription factors. *Adv Pharmacol* 2016;76:103-45.
81. Perisic T, Holsboer F, Rein T, Zschocke J. The CpG island shore of the GLT-1 gene acts as a methylation-sensitive enhancer. *Glia* 2012;60(9):1345-55.
82. Park SM, Plachez C, Huang S. Sex-dependent motor deficit and increased anxiety-like states in mice lacking autism-associated gene slit3. *Front Behav Neurosci* 2018;12:261.
83. 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.
84. 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.
85. Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* 2010;68(12):1100-6.
86. Banerjee A, Luong JA, Ho A, Saib AO, Ploski JE. Overexpression of Homer1a in the basal and lateral amygdala impairs fear conditioning and induces an autism-like social impairment. *Mol Autism* 2016;7:16.
87. Ghanizadeh A, Berk M. Beta-lactam antibiotics as a possible novel therapy for managing epilepsy and autism, a case report and review of literature. *Iran J Child Neurol* 2015;9(1):99-102.
88. John CS, Sypek EI, Carlezon WA, Cohen BM, Ongur D, Bechtholt AJ. Blockade of the GLT-1 transporter in the central nucleus of the amygdala induces both anxiety and depressive-like symptoms. *Neuropsychopharmacology* 2015;40(7):1700-8.
89. Matos-Ocasio F, Hernandez-Lopez A, Thompson KJ. Ceftriaxone, a GLT-1 transporter activator, disrupts hippocampal learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;122:118-21.
90. Şavlı E. Behavioural responses in rats; modulation with beta-lactam antibiotics and antioxidants. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2014;31(1):43-50.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### ŞEKİLLER

Şekil 1. Rotarod cihazı .....	15
Şekil 2. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik test düzeneği .....	17
Şekil 3. Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği .....	18
Şekil 4. Hot plate cihazı .....	19
Şekil 5. Açık alan test düzeneği .....	20
Şekil 6. Rotarod testi, mil üzerinde kalınan en uzun süre .....	24
Şekil 7. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi .....	25
Şekil 8. Yükseltilmiş artı labirent testi .....	26
Şekil 9. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri .....	27
Şekil 10. Açık alan testi.....	28
Şekil 11. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi .....	29
Şekil 12. Yükseltilmiş artı labirent testi .....	30
Şekil 13. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri .....	30
Şekil 14. Açık alan testi.....	31
Şekil 15. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi .....	32
Şekil 16. Yükseltilmiş artı labirent testi .....	33
Şekil 17. Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri .....	33
Şekil 18. Açık alan testi.....	34
Şekil 19. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi .....	36

<b>Şekil 20.</b> Yükseltilmiş artı labirent testi .....	37
<b>Şekil 21.</b> Hot plate testi, plakadan pençe çekme süreleri .....	37
<b>Şekil 22.</b> Açık alan testi.....	38
<b>Şekil 23.</b> Western blotting analizi, GLT-1/B-aktin miktarları .....	39
<b>Şekil 24.</b> Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	40
<b>Şekil 25.</b> Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	41
<b>Şekil 26.</b> Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	41
<b>Şekil 27.</b> Hipokampus CA1 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	42
<b>Şekil 28.</b> Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	43
<b>Şekil 29.</b> Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	43
<b>Şekil 30.</b> Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	44
<b>Şekil 31.</b> Hipokampus CA2 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	45
<b>Şekil 32.</b> Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	46
<b>Şekil 33.</b> Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	46
<b>Şekil 34.</b> Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	47
<b>Şekil 35.</b> Hipokampus CA3 bölgesi immünpozitif reaksiyon.....	48

## **TABLolar**

<b>Tablo 1.</b> Çalışma grupları ve uygulanan enjeksiyonlar .....	14
---	----

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Rize’de doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi İzmir’de, lise eğitimimi ise Kocaeli’nde tamamladım. Ardından İstanbul Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2013 yılında derece ile mezun oldum. 2013 yılı Temmuz ayında İstanbul’da özel bir hastanenin eczanesinde mesul müdür olarak göreve başladım. 2014 yılı Haziran ayı itibariyle Edirne İl Sağlık Müdürlüğü’nde eczacı olarak görev yapmaktayım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım.

**EKLER**





T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2017/04

Karar Tarihi: 28.04.2017

KARAR NO: 2017.04.05

Yürütücülüğündeki Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özgür GÖNDÜZ'ün yaptığı Ecz. Gamze GÖR'ün Yüksek Lisans Tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2016/43 protokol nolu "Farelerde valproik asit ile oluşturulan otizm modelinde seftriaksonun etkisi" başlıklı çalışmanın Yürütücüsünün Yrd. Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ olarak değiştirilmesi önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabilmesine mevduatın oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM  
Başkan

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

Vet. Hekim. Ayşe ÇEKİRÇE  
Vet. Hek. Üye

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA  
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

-İZİNLI -  
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN  
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

-İZİNLI -  
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN  
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

-KATILMAADI -  
Doç. Dr. Elvan BAKAR  
İzmirlik Fakültesi Öğretim Üyesi  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

Ecz. F. Ayşe GÜLER  
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye

Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır

-MAREBETLI -  
Osman GÜTEKİN  
Sivil Üye  
Araştırma ile İlişki:  var  yok  
Toplantı Katılımı:  evet  hayır