

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ

**FARELERDE VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN  
DENEYSEL OTİZM MODELİNDE  
ASETİL-L-KARNİTİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gökberk YILDIRIM**

EDİRNE – 2018

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ

**FARELERDE VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN  
DENEYSEL OTİZM MODELİNDE  
ASETİL-L-KARNİTİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gökberk YILDIRIM**

Destekleyen Kurum: TÜBAP - 2016/127

Tez no:

EDİRNE – 2018



## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımnda değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, ayrıca Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ, Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'a ve bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Uzm. Kübra DUVAN AYDEMİR, Zeynep ÇETİN, Sinem YILMAZ'a, beni destekleyen aileme ve desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	2
<b>OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU</b> .....	2
<b>VALPROİK ASİT</b> .....	6
<b>TERATOJENLER İLE OLUŞTURULAN OTİZM MODELLERİ</b> .....	7
<b>ASETİL-L-KARNİTİN</b> .....	10
<b>OTİZM VE ASETİL-L-KARNİTİN İLİŞKİSİ</b> .....	10
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	12
<b>BULGULAR</b> .....	23
<b>TARTIŞMA</b> .....	41
<b>SONUÇLAR</b> .....	47
<b>ÖZET</b> .....	49
<b>SUMMARY</b> .....	51
<b>KAYNAKLAR</b> .....	53
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	62
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	64
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ALCAR</b>	: Asetil-L-karnitin
<b>G</b>	: Gestasyonel
<b>i.p.</b>	: İnteraperitoneal
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>OSB</b>	: Otizm spektrum bozukluğu
<b>VPA</b>	: Valproik asit

## GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB); sosyal etkileşimde bozulma, iletişimde anormallik, ilgi ve etkinlikte yetersizlik, sınırlı ve tekrar edici davranışlarla karakterize nörogelişimsel bir hastalıktır. Otizm bu belirtilerin dışında beraberinde birçok hastalık ile beraber varlık göstermektedir (1). Toplumda giderek görülme sıklığının artması, kesin etyolojisinin bilinmemesi ve henüz medikal bir tedavisinin bulunamaması güncelliğini korumasına ve birçok çalışma yapılmasına neden olmaktadır. Bu çalışmalar genelde otizm etiyolojisinin anlaşılması, oluşumunun engellenmesi veya tedavisine yöneliktir. Valproik asit (VPA) (2), talidomid (3), etanol (4) gibi kimyasallarla hayvanlarda oluşturulan birçok deneysel otizm modelinde D vitamini (5), oksitosin (6), N-asetil sistein (7), minosiklin (8), astaksantin (9), dokosaheksaenoik asit (DHA) (10) ve akupunktur (11) gibi çeşitli ilaç ve yöntemler otizmin tedavisinde denenmişlerdir.

Çalışmamızın amacı; gebeliğinin 12,5. gününde VPA'ya maruz kalan annelerden doğan erkek farelerde asetil-L-karnitin (ALCAR)'in etkisini incelemektir. VPA-nedenli deneysel otizm modelinde ALCAR'ın prenatal ve postnatal etkisini araştırmak için iki deney planlanmıştır. Gebe annelere ALCAR uygulaması yaptığımız birinci deneyde prenatal dönemde ALCAR'ın fetüs üzerinde VPA'nın otizm oluşturmalarını engelleyici etkisini, postnatal dönemde uygulama yaptığımız ikinci deneyde ise anne karnında VPA'ya maruz kalma sonrası doğan yavru farelerde ALCAR'ın otizmi tedavi edici etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU

Otizm son zamanlarda adını sıkça duyduğumuz bir hastalıktır. Bu hastalığın çevremizde farkındalığının artması ile erken tanı ve tedavide özel eğitimin öneminin anlaşılması olumlu gelişmeler olmasına rağmen, henüz otistik bireylerin topluma kazandırılması ve tedavisi gereken düzeye ulaşamamıştır.

#### Tanım

Otizm, bireylerin etkileşimlerini olumsuz etkileyen, davranış ve iletişim bozukluklarına yol açan, toplumda sık görülen nörogelişimsel bir hastalıktır. Otistik bireyler özel eğitim kategorisi içerisinde yer alırlar. Otizm tanımı ilk kez 1943'te Amerikalı psikiyatrist Leo Kanner tarafından kullanılmıştır (12). Günümüzde, birçok araştırmaya rağmen otizm gizemini hala korumaktadır. Oluşma nedenleri, tedavisi ve eğitimi hala tartışılan konular arasındadır.

Otizm spektrum bozukluğu; sosyal etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde anormallik, sınırlı ve tekrarlayıcı davranışlarla karakterize edilen, aynılıkta ısrarcılık, rutinlere bağlılık ve duyuşsal uyarılara aşırı duyarlılık ya da duyarsızlıkla kendini gösteren genellikle üç yaşından önce ortaya çıkıp yaşam boyu süren, genetik temelleri ve anormal beyin gelişimi olan nörogelişimsel bir hastalıktır (13).

Otizm Amerika Birleşik Devletleri'nde her 36 çocuktan birinde görülmektedir (14). Günümüzde görülme sıklığı giderek artmaktadır. Türkiye'de görülme sıklığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Cinsiyet olarak baktığımızda erkek çocuklardaki görülme sıklığı kız çocuklara kıyasla 5 kat daha fazladır (15). Başka bir düşünceye göre ise erkek ve kız çocukları arasındaki yaygınlık farkı, tanısız ön yargılara da dayanabilmektedir (16,17). Erkeklerde sık görülmesine rağmen, erkek çocuklar kız çocuklara oranla hastalığı daha hafif yaşamaktadırlar. Otistik bir çocuğa sahip ailenin diğer çocuklarının otistik olma ihtimali % 2 ile % 7 arasındadır. Bu oran tek yumurta ikizlerinde % 60 ile % 90'a çıkabilmektedir. 35 yaşından daha yaşlı anne olan bir bireyin çocuğunun otistik olma ihtimali daha genç bir anne adayına göre % 35 daha fazladır. Otizmlili bireylerin aileleri incelendiğinde bireylerin ailelerinin % 35'inde; alkol ve madde bağımlılığı, kaygı bozukluğu, depresyon, psikolojik sorunlar ve şizofreni görülmektedir (12).

Otizm doğumdan önce testi olan ya da herhangi bir teknikle fark edilebilen bir hastalık değildir. Fark edilemediği için engellenemez bir hastalıktır. Tanısı, erken yaşlarda (0-2) doktor, aile, bakıcı varsa öğretmeni ile birlikte konulur. Otizm yanında birçok hastalığı beraberinde getiren bir hastalık olduğu için tanıyı koymak kolay değildir. Bu hastalıklar genelde sindirim sistemi rahatsızlıkları, gelişimsel problemler ve motor fonksiyonların zayıflıklarıdır. Otizm tanısında 6'lı tanı yöntemi kullanılmaktadır. Bunlar:

- Aile veya bakıcı ile görüşme
- İlgili tıbbi, psikolojik veya okul kayıtları
- Bilişsel, gelişimsel değerlendirme
- Doğrudan oyununu gözlemleme
- Adaptif işlevsellik ölçümü
- Kapsamlı tıbbi muayenedir.

### **Otizmin Tipik Belirtileri**

Otistik bireylerde genelde tanı koymayı kolaylaştıran bazı temel davranış bozuklukları bulunmaktadır. Bunlar her otistik bireyde görülmediği gibi düzeyleri de bireyden bireye farklı olabilmektedir. Otistik bireyler genelde yalnız kalmayı severler. Sağlıklı bireylerle iletişimden kaçarlar. İletişim anında sorulan soruya cevap vermek yerine soruyu tekrarlamayı tercih ederler. Sosyal olmayı tercih etmezler. Kişilerle iletişim esnasında göz teması kurmaktan kaçınırlar. Mevcut durumlarının bozulmamasını ve stabil kalmasını isterler. İçinde



buldukları durum bozulduğunda huzursuz olurlar ve aşırı tepkiler verebilirler. Hiçbir şey olmadan ağlayabilir ya da gülebilirler (12).

Sağlıklı bir çocukla kıyaslandığında aşırı hareketli ya da hareketsiz olabilirler. Genelde tehlikeyi fark etmezler, tehlikeye karşı duyarsızdırlar. Tekrarlı hareketlerden hoşlanırlar, hep aynı oyunu oynamak isterler. Nadiren acıya çok hassas, genelde acıya karşı duyarsızdırlar. Çoğu zaman ihtiyaçlarını belirtmezler, belirtmekte zorlanır ve strese girerler. Temas ve sevimlik onları rahatsız edebilir. Standart eğitim yöntemlerine tepki vermezler. Özel eğitim ile belirli mesafeler alınabilir (12).

Otistik bireylerin % 78 ile % 88'inde '*Leaky Gut*' hastalığı bulunmaktadır (18). Bağırsakların normalden daha geçirgen olması şeklinde tanımlanan bu durum, gastrointestinal sistem ile otizm hastalığının ilişki içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Otistik bireylerde beslenme çok önemlidir, çoğu buğday gibi bazı tahılların ve sütün sindiriminde görev alan enzimlerin çoğuna sahip değildirler. İshal, kabız ve davranış problemleri olan otistik bireylerde beslenme programları bu verilere göre düzenlendiğinde, olumlu anlamda gelişmeler yaşanmıştır. Bunlara ek olarak otistik çocuklarda bağışıklık sisteminde yetersizlik, hormonal bozukluk, alerji, sindirim sistemi bozuklukları veya yetersizlikleri, epilepsi, astım, kalp damar hastalıkları, kemik erimesi, diyabet ve çeşitli kanserler görülebilmektedir (2).

### **Otizmin Nedenleri ve Zemin Hazırlayan Parametreler**

Beynin prenatal ve postnatal gelişiminde, nörolojik sistemlerin etkileşimleri ve birbirilerine yolladıkları uyarılar önemlidir. Otizm tek bir nöronal sistemin değil, birçok nöronal sistemin etkilendiği bir hastalıktır. Otizmde beyin gelişimin olumsuz yönde etkilendiği, nörogelişimsel faktörlerin beyin işlevsel sistemlerinin çoğunu ya da tamamını etkilediği bilinmektedir (2).

Teratojenler ile yapılan nöroanatomik çalışmalar, gebelikte beyin gelişiminin etkilenmesinin otizme neden olabileceğini göstermiştir. Beyinde oluşan bu olumsuz etki birçok patolojik olaya yol açabilmektedir. Otistik çocuklarda yapılan postmortem incelemelerde kafa çevresi, beyin hacmi ve ağırlığı normal çocuklara göre daha fazladır. Bu çocuklarda beyin hızlı büyüdüğü ve bu yüzden fonksiyon kaybı olduğu düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak da, beyin gelişimi sırasında nöronal sistemin etkileşimi sürecindeki bir bozukluğun, bir dizi soruna yola açtığı ve otizme neden olabildiği söylenmektedir (19).

Otistik bireylerde amigdalada ve amigdalanın fusiform girus, üst temporal sulkusunun diğer temporal alanlar ile olan bağlantısında bir sorun olduğu, bu nedenle çevresindeki insanların göz gibi sosyal ifade bölgelerine değil de, ağız bölgelerine baktıkları düşünülmektedir (20). Otizmin serotonin ile olan ilişkisiyle ilgili son dönemde pek çok yayın yapılmıştır. Gebelerin ikinci ve/veya üçüncü trimesterlerinde selektif serotonin geri alım inhibitörü içeren antidepresan ilaç kullanımlarının otizm riskini artırdığı gösterilmiştir (21).

Manyetik rezonans görüntüleme (*magnetic resonance imaging-MRI*), pozitron emisyon tomografisi (*positron emission tomography-PET*) gibi tekniklerin gelişmesiyle otizmin bilinmezleri gün ışığına çıkmaktadır. Yapılan görüntülemelerde, otizmlili bireylerin nörotransmitter sistemleri, glukoz metabolizmaları, nöroimmün yanıtları sağlıklı bireylerden farklı olduğu gibi beynin her iki yarımküresini birbirine bağlayan korpus kallosum adı verilen kısmın normalden daha küçük olduğu anlaşılmıştır (22).

Otizm genetik temeli olan bir hastalık olarak da düşünülmektedir. Bunu kanıtlamak için yapılan genetik çalışmalar da bulunmaktadır (23). Genetik etmenlerin dışında çevresel etmenler de otizmin oluşmasında rol oynayabilirler. Bunlar;

- meslek nedenli vücutta ağır metal birikimi
- annenin gebeliği süresince maruz kaldığı ağır metal etkisi
- amalgam dolgular
- deniz ürünleri (civa)
- rhogam aşular
- hamilelikte karın bölgesine uygulanan kırışıklık önleyici kremler (civa)
- rujlar (civa)
- ojeler (kurşun)'dir (24).

Çocukta ise; aşular, çevresel koşullar, antibiyotikler, immün hastalıklar ve gastrointestinal geçirgenlik otizm oluşumunda rol oynar (25). Bazı virüs, bakteri ve mantarların otizmin oluşmasına katkı sağladığı da gösterilmiştir (26).

## **Otizm ve Genetik Parametreler**

Son dönemdeki çalışmalar otizmde kalıtımsallığı % 50 olarak göstermektedir (27). Otizm tek bir genin etkisinden çok, birden fazla genin dahil olduğu karmaşık bir genetik bozukluktur. 13 ve 18. kromozom dışındaki tüm kromozomlarda otizmle ilgili bozukluklara rastlanılmıştır Bu bozukluklar gen mutasyonları ve kopya sayılarındaki farklılardan oluşur (12).

Otizm spektrum bozukluğu ile birçok genin ilişkisi olduğu gösterilmiştir. HD8, ARID1B, SYNGAP1, DYRK1A, SCN2A, ANK2, ADNP, DSCAM, CHD2, KDM5B, SUV420H1, GRIN2B, ASH1L ve POGZ bu genlerden bazılarıdır (28).

## **Tedavi**

Günümüzde otizmin mevcut bir tedavisi olmamakla birlikte, otizmin etkilerini ve beraberinde getirdiği hastalıkların sonuçlarını azaltacak tedaviler mevcuttur. Bunlar; ilaç, özel eğitim, hidroterapi, hayvanlarla terapi (hippoterapi ve yunus terapisi), müzik terapisi, beslenme ve diyetin düzenlenmesi, ağır metal kaynağının kurutulması, hiperbarik oksijen tedavisi ve uzay terapidir.

## **VALPROİK ASİT**

Valproik asit veya 2-propilpentanoik asit, günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan anti epileptik bir ilaçtır. Ayrıca bipolar affektif bozukluk, şizofreni ve migren profilaksisinde de reçete edilebilmektedir (29). Kimyasal formülü  $C_8H_{16}O_2$ 'dir. VPA, sinir sistemini modüle edici etkiler göstermektedir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada, gebelik sırasında annenin VPA kullanımının yavruların otistik olma riskini önemli ölçüde arttırdığı (% 4,42) gösterilmiştir (2).

Prospektif 11 yıllık bir diğer çalışmada, anne karnında tek doz VPA terapisine maruz kalan çocuklarda nörogelişimsel bozuklukların yaygınlık oranının 6 kat arttığı, VPA poli-terapisine maruz kalanlarda ise bu oran 10 kat olarak bildirilmiştir (30).

Valproik asit kullanımının klinikte oluşturduğu yan etkiler bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Bu yan etkiler;

- gen ekspresyon değişiklikleri
- serebellum, korteks anomalileri
- kulak anomalileri
- oksidatif stres artışıdır (2).

Klinik çalışmalar, gebelik esnasında VPA maruziyetinin gelişimsel gecikme, bilişsel bozukluklar ve otizm gibi birçok risk ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bunların yanında gebeliğin ilk 3 ayında VPA'ya maruz kalan annelerin yavrularında nöral tüp defektleri, atriyal septal defekt, yarık damak, hipospadias, polidaktili ve kraniosinostoz görülmektedir. “Fetal Valproik Asit Sendromu”na sahip bireylerde kraniofasiyal anomaliler ve organ malformasyonları olduğu bildirilmiştir (31). İlginç olarak, prenatal dönemde VPA'ya maruz kalmış kemiriciler de, otistik bireylerde gözlenen davranışsal bozukluklara benzer bulgular göstermektedirler (2). VPA maruziyeti gama aminobütirik asit (GABA) seviyelerinin yükselmesine neden olmaktadır. GABA ise beyindeki sinir ağlarının oluşumunda kritik bir role sahiptir (32).

## **TERATOJENLER İLE OLUŞTURULAN OTİZM MODELLERİ**

Birçok çevresel faktörün otizmin etiolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. Bilim insanları bu faktörleri deney hayvanlarına simüle ederek hastalığı anlamaya çalışmışlardır. Doğum öncesi ve doğumdan sonraki ilk dönemlerde beyin gelişiminin etkilenmesiyle otizm benzeri davranışlar ortaya çıkmaktadır. Bu durumu etkileyen teratojenler, hayvan modeli oluşturulmasında etkili olmuştur. VPA, talidomid ve etanole prenatal dönemde maruziyet hayvanlarda otizm benzeri davranışlar sergilenmesine yol açmıştır (33). Çalışmamızda literatür taraması sonucu en sık kullanılan model olan VPA ile oluşturulan otizm modeli tercih edilmiştir (2-4,33).

### **Valproik Asit Nedenli Otizm Modeli**

Valproik asit nedenli otizm modeli Rodier ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (1996). VPA'nın insandaki yan etkileri göz önüne alınarak hayvanlarda da otizme benzer etkiler oluşturabileceği düşünülmüştür. Sıçanlarda denenen ilk çalışmada VPA tek doz 350 mg/kg olarak uygulanmıştır. Bu tarihten sonra prenatal olarak VPA'ya maruz kalmış

kemirgenler, otizmde davranışla ilişkili moleküler yolların keşfi ve otizm benzeri davranışların testi için yaygın olarak kullanılmıştır.

Günümüzde kullanılan VPA nedenli otizm hayvan modeli bu şekilde oluşturulmuştur. Belirli standart temele oturan modelde gebe fare ya da sıçanlara gebeliğinin 12,5-13. gününde 600 mg/kg dozda VPA uygulandığında doğan yavruların (özellikle erkek yavrular) otizm benzeri davranışlar gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir. Schneider ve Przewlocki oluşturulan modelde deney hayvanlarındaki davranış bozukluklarını davranış testleriyle inceleyen ilk araştırmacılar (2). Deneylerinde erkek sıçanların, otizm benzeri davranışlar gösterdiklerini, sosyal davranışların ve lokomotor aktivitenin azaldığını gözlemlemişlerdir (34,35). Sosyal bozulmaların yanı sıra deney hayvanlarında kendine bakım ve kazma alışkanlıklarını inceleyen bazı çalışmalar VPA'ya maruz kalan hayvanlarda kalıplaşmış, tekrarlı davranışların arttığını göstermektedir (2).

Sıçanlarda VPA maruziyeti geç olgunlaşma (geç göz açılması), düşük vücut ağırlığı ve gecikmiş motor gelişimine neden olmuştur (36). VPA'dan başka etanol ve talidomid de hayvan modeli oluşturmak için denenmiştir ancak yaygın olarak kullanılan otizm hayvan modeli VPA ile oluşturulan modeldir.

Valproik asite maruziyet zamanı da modelin oluşması için önemlidir. 12,5. günde maruz kalan fareler ile 9 ve 14,5 günde maruz kalan fareler otistik benzeri davranışlarda farklılıklar göstermiştir (37).

Diğer kimyasallarla oluşturulan otizm hayvan modellerinde, VPA'ya maruz kalmış kemirgenlerde görüldüğü gibi insanda oluşan otizm belirtilerinin tümü ortaya çıkamayabilmektedir. Bu çalışmalar da tabii ki otizmin etiyolojisini, maternal etkileri ve biyolojisini açıklamaya ve yeni tedavilerin ortaya çıkmasına yardımcı olurlar. VPA'ya prenatal dönemde maruz kalma ve otizm arasındaki ilişki birçok çalışmada doğrulanmıştır (2,36,38,).

Kataoka ve ark. (39) 'nın yaptığı çalışmada; gebeliğin 12,5. gününde VPA'ya maruz kalmanın erkek farelerde nöronal hücre sayısını azalttığı, böylelikle erkek fare prefrontal ve somatosensör kortekslerinin yapısını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) beyin gelişimi için önemli bir proteindir ve VPA'ya maruz kalan farelerin somatosensör korteksinde BDNF mRNA'sının daha düşük eksprese edildiği gösterilmiştir (40).

Bizler de farelerde deneysel otizm modeli oluştururken literatürde bahsedilen kriterleri inceledik ve araştırmamızı buna göre planladık. Çalışmamızda harem usulü çiftleşmeye alınan dişi farelere 12,5 günlerinde tek doz 600 mg/kg VPA enjeksiyonu yapılmıştır. Gebe farelere

standart diyetleri dışında bir program uygulanmamıştır. Normal şartlarda geçirilen gebelik sonunda tüm hayvanlar doğum yapmıştır.

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

Talidomid bir sedatif olarak ilk kez 1950’lerde sentezlenmiştir. Sentezlendiğinde insanda potent teratojenisite beklenmeyen bir durumdur (41). Bu yıllarda anksiyete ve uykusuzluk tedavisi için kullanılmıştır. Daha sonra talidomide maruz kalan çocuklarda konjenital malformasyonların artmış olduğu bildirildi ve bu durum “Fetal Talidomid Sendromu” olarak adlandırıldı. Talidomidin bu etkisinin anti-anjiyojenik özelliğine bağlı olduğu düşünülmektedir ancak etki mekanizması henüz belirsizliğini korumaktadır (42).

Talidomid DNA ile doğrudan etkileşerek hücre göçünü engelleyebilmektedir (43). İnsanlarda fertilizasyondan sonraki 20-24. günlerdeki ilaç maruziyetinin otizme neden olduğu düşünülmektedir. İnsanlardaki bu dönem hayvan modellerinde 8 ile 10.5 gün olarak düşünülmektedir (44). Bu durumdan yola çıkarak oluşturulmak istenilen hayvan modellerinde bu dönem hedef alınmıştır.

2010 yılında yapılan bir çalışmada 20 mg/kg uygulanan talidomid dozu maymun embriyosunda global gen ekspresyon profilinin değişmesine neden olmuştur. Primat ve farelerde talidomid farklı etkiler gösterebilmektedir (45).

Bir diğer çalışmada prenatal talidomide maruz kalmış sıçanlarda öğrenme zorluğu ve yanlış seçim yapma davranışları (46) ayrıca hem talidomid hem de VPA ile oluşturulan deneysel otizm modellerinde insanda görülene benzer şekilde hayvanlarda da hiperaktivite benzeri davranışlar görülmüştür (46).

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

Etanolün kötüye kullanımı bir sağlık sorunudur. Gebelerde etanol kullanımı birçok ülkede artmıştır (47). Etanole maruziyet “Fetal Alkol Sendromu” terimi altında incelenmektedir. Etanolün teratojenik etkisini; hücre çoğalmasını, göç ve apoptozu de-regüle ederek gösterdiği düşünülmektedir (48).

Etanol nedenli deneysel otizm modellerinde hayvanlarda sosyal davranış bozuklukları ve sosyal oyunlarda değişiklikler görülmüştür (49). Histolojik çalışmalar sıçanlarda etanole maruz kalmanın serotonerjik nöronların göçlerini ve sayılarını etkilediğini göstermiştir (41).

## **ASETİL-L-KARNİTİN**

Asetil-L-karnitin, L-karnitinin bir esteridir ve karnitinin reversibl asetilasyonu beyinde sentezlenir. Beyine iyi dağılım gösterir ve beyinde pek çok etkiye sahiptir. Asıl rolü mitokondriyada yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ve adenosin trifosfat (ATP) oluşumu yani enerji metabolizmasıdır. Pek çok çalışmada L-karnitin ve ALCAR'ın beyinde nörodejeneratif ve yaşlanmaya bağlı durumlarda oksidatif stres üzerine etkisiyle nöroprotektif ve güçlü antioksidan etkileri olduğu kanıtlanmıştır (39,50). Ayrıca nöronların erken gelişim evrelerinde ALCAR uygulanmasının beyinde reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumunu azalttığı, nörodejenerasyondan koruduğu ve inhalasyon anestezi ilaçlarına bağlı sıçan kortikal nöronlarında oluşan nörotoksiteyi önlediği gösterilmiştir (51). Karnitin eksikliğinin nörogelişmeyi ya da özel olarak nörojenez bozduğu düşünülmektedir (52). Ayrıca vücutta karnitin eksikliğinin mitokondriyal kopya sayısını negatif yönde etkilediği de çalışmalarda gösterilmiştir (52). Bir başka çalışmada ise; ALCAR'ın yaşa bağlı mitokondriyal disfonksiyonu ve nöronların oksidatif hasarını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (53).

Diğer taraftan oksidatif stress üzerine adjuvant artrit, gastrik ülser modelleri, iskemi-reperfüzyon hasarı, infertilite gibi farklı deneysel modellerde antioksidan etkisi gösterilmiş olan karnitin ve türevlerinin (54-59), Alzheimer gibi hafıza bozukluklarında da güçlü antioksidan etkisi ile nöroprotektif etkisi kanıtlanmıştır (60).

Asetil-L-karnitin özellikle nöropatik ağrıda olmak üzere, analjezik ve antinosiseptif etkisi konusunda da çalışmalar bulunmaktadır (61,62) Nöropatik ağrı üzerine etkisinin nöroprotektif ve antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (63).

## **OTİZM VE ASETİL-L-KARNİTİN İLİŞKİSİ**

Beaudet'in (52) 2017 yılında yaptığı çalışmada gıda ile elde edilen (primer) ve üretilen karnitin (sekonder) eksikliğinin otizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca erken yaşlarda diyetin düzenlenmesinin otizm benzeri davranışlara sahip ve henüz tanı konmamış bireylerin sorunlarını çözebileceği düşünülmektedir. Sekonder karnitin eksikliğine sahip hastalarda yağ asit metabolizmasının da bozuk olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, idrarla kaybedilen karnitin eksikliğinin otizm ile ilişkili olabileceği de belirtilmiştir.

Bizler yaptığımız literatür taraması sonucunda pekçok çalışmada ALCAR'ın antioksidan özelliğiyle oksidatif stresi ortadan kaldırdığını, nöroprotektif etkisini ve nörodejenerasyonu azalttığını gözlemledik. Yine en sık kullanılan deneysel otizm modeli olan VPA nedenli otizm modelinde karar kıldıktan sonra otizm oluşumunu engelleyebilecek veya etkilerini azaltabilecek maddeleri ararken birçok çalışmayla karşılaştık. Prenatal VPA

maruziyeti sosyal iletişimi, intestinal motiliteyi azaltırken, bu modelde uygulanan minosiklinin tüm bunları olumlu yönde değiştirdiği gösterilmiştir (8). VPA ile deney hayvanlarında oluşturulan modelde hayvanlarda otizm benzeri davranışlar görülürken, dokosaheksaenoik asit uygulamasından sonra hücre apoptosisinin azaldığı, kognitif bozulmanın önlendiği, öğrenme ve belleğin düzeldiği bulunmuştur (10). Bir diğer çalışmada da, antioksidan özelliği bilinen astaksantin deneysel otizm modelinde glutasyonu ve katalazı olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (9). Literatürde fare ve sıçanlarda VPA ile oluşturulmuş birçok deneysel otizm modelinde antioksidan, nöroprotektif vd. özellikleri nedeniyle otizmin önlenmesi ya da tedavisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır, fakat yaptığımız tarama sonucu ALCAR'ın otizm üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanamamıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı biz de çalışmamızda nöroprotektif ve antioksidan özellikleri birçok çalışmada gösterilmiş olan ALCAR'ın VPA ile oluşturulan deneysel otizm modelindeki etkilerini incelemeye karar verdik.



## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış ve Ağrı Laboratuvarlarında İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Yaptığımız araştırma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu onayı alındı (TÜHADYEK-2016/12) (Ek-1) ve çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2016/127) (Ek-2) tarafından desteklendi.

### **DENEKLER**

Araştırmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminde üretilmiş olan 20-30 gram ağırlığında Balb/c türü erkek ve dişi farelerin çiftleşmesiyle elde edilen ve prenatal dönemlerinde VPA'ya maruz kalmış bu dişilerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı. Toplam 64 adet erkek Balb/c yavru fare, her deneyde 4 grup ve 8'er hayvan olacak şekilde ayrıldı. Tüm denekler otomatik olarak ayarlanan standart laboratuvar koşullarında (22±1 °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) barındırıldılar. Beslenmeleri için standart fare yemi ve musluk suyu kullanıldı, yem ve su miktarında herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

### **KULLANILAN İLAÇLAR**

Çalışmamızda deneysel otizm modeli literatür taraması sonucu en sık kullanılan kimyasal olan VPA ile oluşturulmuş ve en yaygın kullanılan doz olan 600 mg/kg olarak seçilmiştir (2,59,64). VPA (Sigma), salin (%0,9 NaCl, serum fizyolojik) solüsyonunda çözülerek ve 10 ml/kg volümde uygulanmıştır. Otizmin prenatal dönemde önlenmesi veya

postnatal dönemde tedavisindeki rolünü araştırmak amacıyla kullandığımız ALCAR'ın dozu da yine literatür taraması sonucu en sık kullanılan doz olan 100 mg/kg olarak belirlenmiştir (53,65). Kontrol gruplarına salin (10 ml/kg) uygulanmıştır. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) yoldan yapılmıştır.

Çalışmamızda, gebeliğinin 12,5. gününde VPA'ya maruz kalan dişilerden doğan erkek farelerde ALCAR etkisinin incelemesi amacıyla iki deney planlandı:

Deney 1'de gebe anneye ALCAR uygulanmasının yavru farelerde VPA nedenli otizmi engelleyici etkisi, Deney 2'de ise anne karnında VPA'ya maruziyet sonrası doğan yavrulara postnatal dönemde ALCAR uygulanmasının VPA nedenli otizmi tedavi edici etkisi olup olmadığı araştırıldı.

### **Deney 1:**

Grup 1) pozitif kontrol grubudur ve bu grupta gestasyonel (G) 12,5. günde salin (10 ml/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı.

Grup 2) negatif kontrol grubudur ve G12,5. günde VPA (600 mg/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı.

Grup 3) G10-14. günlerde ALCAR (100 mg/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı.

Grup 4) G10-14. günlerde ALCAR (100 mg/kg, i.p.) ve G12,5. günde VPA (600 mg/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru fareler kullanıldı.

### **Deney 2:**

Grup 1) G12,5. günde salin (10 ml/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru farelere 47-51. günler arası salin (10 ml/kg, i.p.) uygulandı.

Grup 2) G12,5. günde salin (10 ml/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru farelere 47-51. günler arası ALCAR (100 mg/kg, i.p.) uygulandı.

Grup 3) G12,5. günde VPA (600 mg/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru farelere 47-51. günler arası salin (10 ml/kg, i.p.) uygulandı.

Grup 4) G12,5. günde VPA (600 mg/kg, i.p.) uygulanmış annelerden doğan erkek yavru farelere P47-51. günler arası ALCAR (100 mg/kg, i.p.) uygulandı.

**Tablo 1. Gruplara uygulanan kimyasallar ve uygulama günleri**

Gruplar		G:0	G:10	G:11	G:12	G:13	G:14		P:47-51
Deneý 1	Grup 1 (salin)	⇒				salin		⇒	
	Grup 2 (VPA)	⇒				VPA		⇒	
	Grup 3 (ALCAR)	⇒	ALCAR	ALCAR	ALCAR	ALCAR	ALCAR	⇒	
	Grup 4 (ALCAR+VPA)	⇒	ALCAR	ALCAR	ALCAR	ALCAR+VPA	ALCAR	⇒	
Deneý 2	Grup 1 (salin+salin)	⇒				salin		⇒	salin
	Grup 2 (salin+ALCAR)	⇒				salin		⇒	ALCAR
	Grup 3 (VPA+salin)	⇒				VPA		⇒	salin
	Grup 4 (VPA+ALCAR)	⇒				VPA		⇒	ALCAR

Her 2 deneyde yavrular 50 günlük olduklarında sırasıyla *rotarod*, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi (*Three Chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*), *hot plate*, açık alan (*Open Field*) ve bağlamsal korku koşullanma (*Fear Conditioning*) testleri uygulandı.

## UYGULANAN DAVRANIŞ TESTLERİ

### Rotarod Testi

Oluşturulan modelin deneklerde motor koordinasyon bozukluğu oluşturup oluşturmadığını anlamak için deney hayvanları rotarod cihazında teste tabi tutuldular. Bu cihaz belirli hızlarla dönen silindirden (rod) ve süre takip kronometresinden oluşmaktadır. Oluşturulan otizm modelinin ve kontrol grubunun değerlendirilmesi için fareler 16 rpm hızında dönen silindirlerde 180 saniye tutulmuştur. Testin prensibi, belirli bir hız (16 rpm) ve yükseklikte (25 cm) dönen bir silindirde yürüyebilmek ya da düzenekten düşmeme temeline dayanır (Şekil 1).

Çalışmamızda test, MAY 972-A Rotarod cihazı (COMMAT) kullanılarak gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce deneklerin ortama alışması için belirli bir süre deneme yapıldı. Birbirinden izole 4 bölümden oluşan cihazda, sırasıyla 4 denek birbirini görmeden teste tabi tutuldular. Hayvanlar mile yerleştirildiğinde el ile kronometre başlatıldı. Denek düzenekten düşmemek için milin dönüş yönünün tersi yönde hareket etmelidir. Denek, düzenekten düştüğünde cihaz tabanında yer alan sensörler kronometreyi durdurdu.

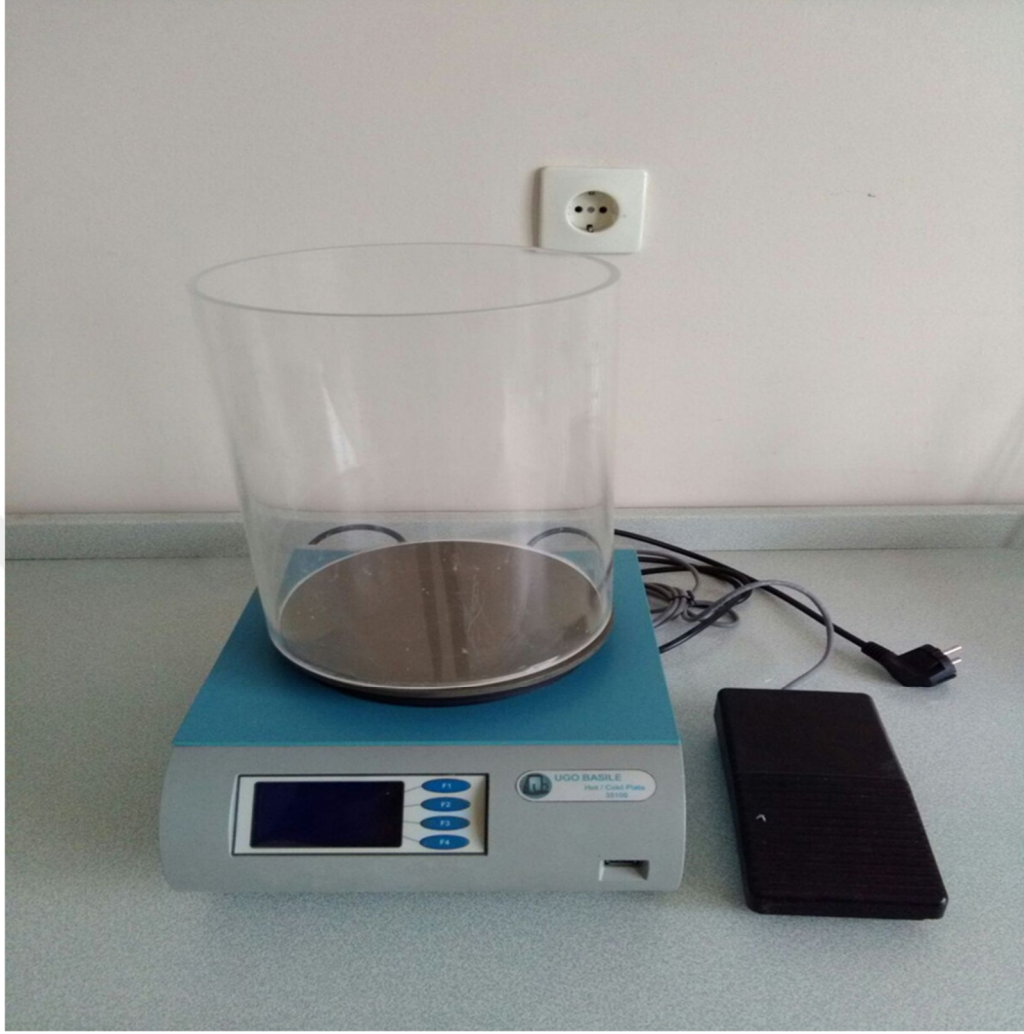
Denekler 3 kez test düzeneğine alınarak elde ettikleri en uzun süre, rotarod testinin verisi olarak kabul edildi. Bu veriler ışığında lokomotor aktivite ve denge becerileri değerlendirildi.



**Şekil 1. Rotarod cihazı**

### **Hot Plate Testi**

Woolfe ve McDonald tarafından 1944 yılında ilk kez tanımlanan yöntem daha sonra Eddy ve Leimbach tarafından geliştirilerek daha sık kullanılmaya başlanmıştır (66). Çalışmamızda hayvanlar, 55°C ısıtılmış tablaya bırakıldıktan sonra takip edildiler. Hayvan düzeneğe bırakıldığı an süre başlatıldı. Hayvanın zıplaması, ayağını yalaması ya da plakadan kaldırması deneyi sonlandırdı. Doku hasarını önlemek için cut-off (sonlandırma) süresi 25 saniye olarak belirlendi ve bu süre sonunda cevap vermeyen fareler deneyden çıkarıldı (Şekil 2).

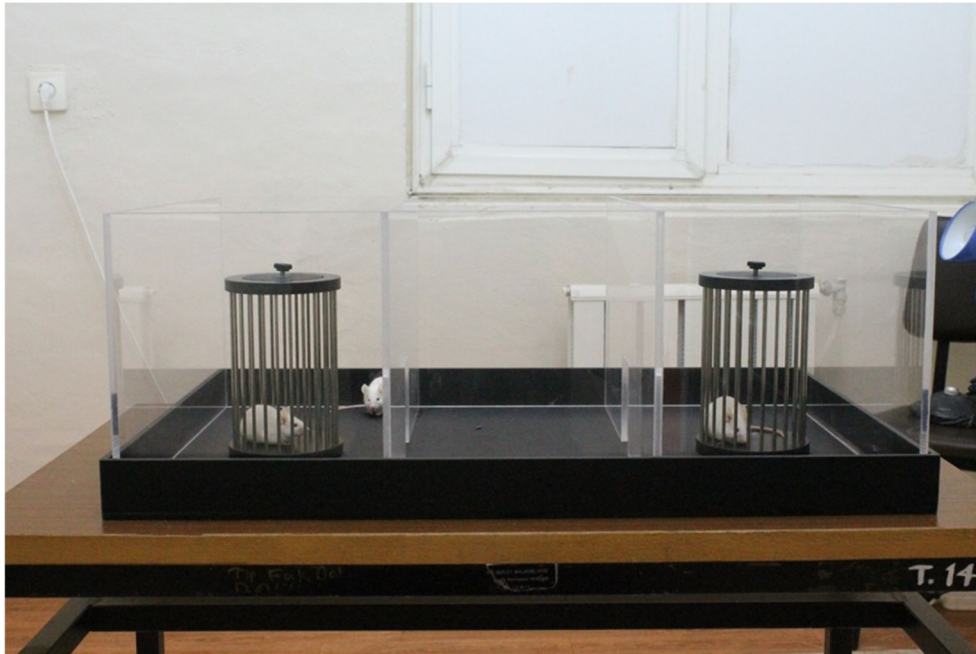


**Şekil 2. Hot plate cihazı**

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

Kemirgenler genellikle diğer kemirgenlerle vakit geçirmeyi tercih etmektedirler. Bu deney, deneğin tanımadığı fare ile sosyalliğinin değerlendirilmesinde kullanılır (Şekil 3). Deney düzeni 2 günden oluşmaktadır. 1. gün sadece ortam alıştırmaları şeklinde tamamlanır. 2. gün deneyin yapıldığı gündür. 2. gün sabah denekler grup sırasına göre test düzeneğine yerleştirildiler. 5, 10 ve 10 dakika olarak her denek için 3 kayıt tutulmuştur. Her kayıt deneğin orta odaya konması ve duvarların kaldırılması ile başladı. Deneğin tekrar orta odaya alınıp duvarların kaldırılması ile bitti. İlk 5 dakikalık kayıt tanınmış yeri hatırlamak amaçlı uygulandığı için analize dahil edilmedi. Birinci 10 dakikada deney düzeneğinin sol tarafında yer alan odadaki kafeste 1 adet aynı ırk ve yaşa sahip fare yer aldı. Bu fare deney gruplarının dışında yabancı bir fareydi. İlk 10 dakikalık bölümde deneğin daha önceden hiç görmediği fareye olan yaklaşımı, onunla kurduğu sosyallik analiz edildi. Bu test boyunca far

her üç odada gezebilecek serbestlikteydi. İlk 10 dakikanın analizinde deneğin yabancı fare ile toplam geçirdiği süre, kat ettiği mesafe ve yabancı fareye olan uzaklığı değerlendirildi. İlk 10 dakika sonunda fare orta bölüme alınıp duvarlar tekrar kapatıldı. Deneyin 2. kısmına geçmeden önce sol odada yer alan kafes, denek görmeden sağdaki boş kafes ile değiştirildi. Sol tarafa konulan boş kafese yeni bir yabancı fare kondu. Son durumda fare orta odada, duvarlar kapalı, sol odada tanımadığı yabancı bir fare ve sağ odada ilk 10 dakikadan tanıdığı fare yer aldı. Duvarların kaldırılmasıyla testin ikinci 10 dakikası başladı. Farenin daha önceden tanıdığı ve yeni konulan yabancıya olan davranışları kayıt edildi. Deneyin ilk 10 dakikası sosyalleşmeyi ölçümlerken, ikinci 10 dakikası sosyal yeniliği ölçümlenmektedir. Deneyin ikinci 10 dakikalık bölümü, ilk 10 dakikalık bölüm ile aynı şartlar altında ilerledi. Her iki bölümde de denek, deney başlamadan önce yabancı fareleri görmedi. Yabancı fare grubu kendi içinde numaralandırıldı ve denek fareler ile test boyunca bir defadan fazla karşılaşmasının önüne geçildi. Yabancı fareler herhangi bir kimyasala ya da teste tabi tutulmadılar. Objeler olarak kullanılıp, analizlerde değerlendirilmediler. 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin yapıldığı gün denekler başka bir teste tabi tutulmadılar. Test, Media Recorder 3 (Noldus) programı ile kayıt edildi. Kayıtlı videolar Ethovision XT 11,5 (Noldus) programı ile analiz edildi. Bu test otizm benzeri özellikler gösteren kemirgenlerin sosyal davranış özelliklerini incelemek üzere kullanılmaktadır (2).



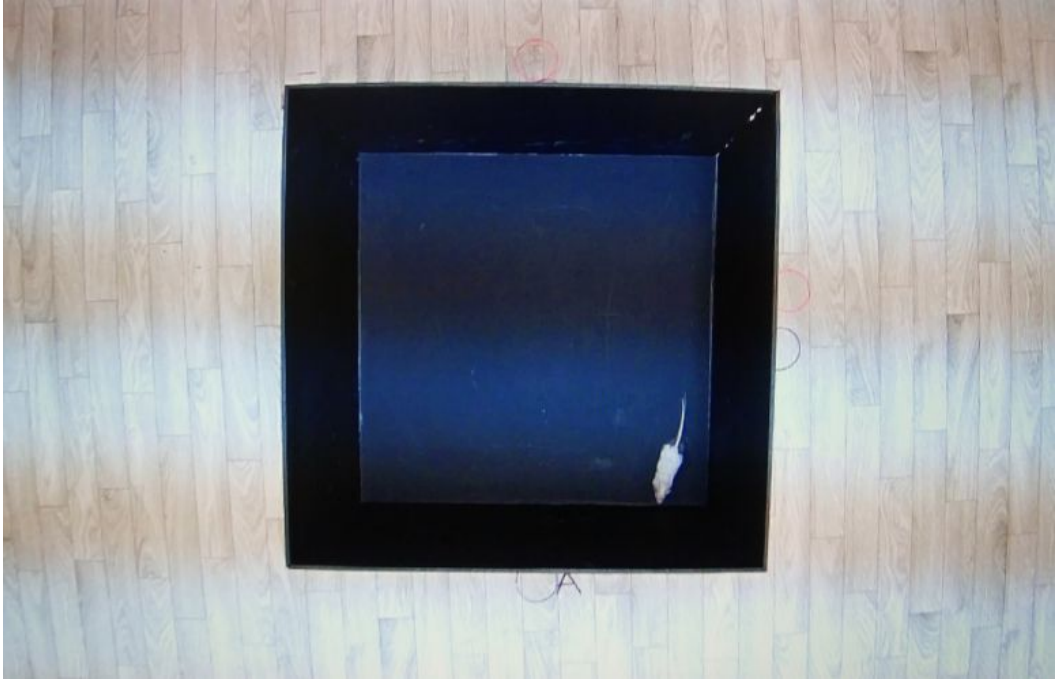
**Şekil 3. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik test düzeni**

### **Açık Alan (Open Field) Testi**

İlk kez 1936 yılında Hall tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde de hayvan fizyolojisinde en popüler testlerden biridir. Deney hayvanının herhangi bir işlem öncesi duygusal durumunu ve işlem sonrasında meydana gelebilecek değişiklikleri saptamak için en çok kullanılan testlerden biridir. Santral sinir sistemi bozuklukları olan deney hayvanları için açık alan testi, genel aktivite düzeylerini, bürüt lokomotor aktivite ve keşif alışkanlıklarını belirlemek için kullanılan basit bir sensorimotor testtir.

Deney düzeneği dört tarafı siyah duvarlarla (60 cm x 60 cm) çevrili, üstü açık pleksiglas malzemeden oluşmaktadır. Deney hayvanının davranışları tavana asılı kamera tarafından kayıt edilir (Şekil 4).

Çalışmamızda test, deney hayvanının düzeneğin merkezine bırakılmasıyla başladı ve 10 dakikalık kayıt tutuldu. Davranışlar Ethovision XT 11,5 yazılımı (Noldus) ile incelendi. 10 dakikanın sonunda kayıt durduruldu ve denek kafesine yerleştirildi. Deney alanı toplam 16 eşit kareye bölündü. Merkezdeki 4 tanesi merkez alan, kenarlardaki kareler perifer alan olarak tanımlandı. Denekler arasında test düzeneği %10'luk etanol ile temizlendi. Test boyunca deneklerin düzeneğin merkezinde geçirdiği süre, toplam kat ettikleri mesafe ve arka ayakları üzerinde durma (*rearing*) sayıları incelendi.



**Şekil 4. Açık alan test düzeneği**

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

Yükseltilmiş artı labirent 2 açık, 2 kapalı ve bunların birleştiği merkez bölgeden oluşmaktadır. Test düzeneği 50 cm x 10 cm boyutlarında ve yerden 50 cm yüksektedir. Karşılıklı kapalı kollar üstü açık, çevresi 40 cm yüksekliğinde pleksiglas duvarlardan oluşur. Seçilen deney hayvanı beyaz renk olduğundan düzeneğin tamamı siyahtır. Kemirgenlerin doğası gereği açık alanda gezmek onlar için stresli olacağından, merkeze bırakıldıktan sonra kapalı alanı tercih etmeleri beklenir (Şekil 5).

Çalışmamızda test, deney hayvanının düzeneğin merkezine bırakılmasıyla başladı. Düzeneğin tepesinde yer alan kamera ile 5 dakikalık kayıt alındı. Kayıt sonunda denek kafesine yerleştirildi. Her hayvandan sonra test düzeneği %10'luk etanol ile temizlendi.



**Şekil 5. Yükseltilmiş artı labirent testi**

### **Bağlamsal Korku Koşullanma (Fear Condition) Testi**

Korku koşullanma testi kemirgen modellerde öğrenilmiş bir davranıştır. Koşullu uyarıcının, koşulsuz durum tekrarlarından sonra hayvanlar bu iki durumu birbirine bağlar ve korkmayı öğrenirler. Korku koşullandırma hızlıca öğrenilir. Sabit ve uzun süreli davranışsal değişim farmakolojik çalışmalar için verimli bir çalışma alanıdır. Korku şartlandırılması, koşullu ve koşulsuz durum belirli bir zaman aralığı ile ayrılır.



Deney düzeneği dışı siyah içi şeffaf pleksiglastan oluşur. İç kısımda yer alan şeffaf pleksiglas 27x27x34 cm ölçülere sahip 16 cm çapında kapağı bulunan bir kutudur. Tabanında şoku iletmekte görevli çelik ızgara yer almaktadır. Cihazın tavanında kamera ve aydınlatma bulunmaktadır (Şekil 6).

Bağlamsal korku koşullanma testi iki günlük bir testtir. Çalışmamızda 1. gün fareler sırasıyla düzeneğe koyulup 7 dakikalık kayıtlar alındı. 2, 4 ve 6. dakikalarda 0,5 mA (1 sn) elektrik şoku verildi. 7. dakikanın sonunda fareler düzeneden alındı.

Testin 2. günü (24 saat sonra) aynı sırayla fareler düzeneğe yerleştirildi. Şok verilmeden 5 dakikalık kayıt alındı. Kayıt sonrası fareler düzeneden alınıp kafeslerine yerleştirildi. Her fareden sonra test düzeneği %10'luk etanol ile temizlendi.

Farelerin davranışları FCS 21200-R sistemi ile incelendi ve toplam donma süreleri hesaplandı.



**Şekil 6. Bağlamsal korku koşullanma testi**

### **Beyin Dokularında Malondialdehit Düzeyi Ölçümü**

Testler bittikten sonraki gün, tüm denekler servikal dislokasyon tekniği ile öldürülüp beyin dokuları çıkarıldı. Tüm gruplardan elde edilen sağ ve sol beyin dokuları malondialdehit (MDA) düzeyleri bakılmak üzere çalışma yapıncaya kadar -80 °C'de saklandılar. 0.15 KCL solüsyonu, MDA düzeyleri için %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Tüpler buz üzerinde tutularak beyin dokuları homojenizatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlardan 1500 g 15 dakika +4°C'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'nın sıcak ve asit ortamda tiyobarbitürük asit (TBA) ile reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Çözeltiler;

1. %8,1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3,5 olarak ayarlandı)
3. %0,8'lik TBA
4. N-Bütanol/Piridin (15:1)

Deneyin yapılışı;

0,2 ml doku homojenatı; 0,2 ml % 8,1'lik SDS, 1,5 ml %20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0,8'lik TBA ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 1 saat süre ile 95 °C'deki sıcak su banyosunda tutuldu. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin eklenerek 1 dABHka vorteksle karıştırıldı. Organik fazın ayrılması için 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ayıraç körüne karşı absorbanslar okundu.

Sonuçların hesaplanması;

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{A \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

A : Absorbans

V<sub>t</sub> : Total reaksiyon hacmi

10<sup>9</sup>: Molün nanomole çevrilmesi

V<sub>s</sub> : Total reaksiyon içindeki numune sayısı

E : Tüketim katsayısı (1,56 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

L : Küvet çapı

10<sup>3</sup> : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/mg protein olarak ifade edildi.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney gruplarında hayvan sayısı 8 olarak belirlendi. *Rotarod*, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi (*Three Chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*), *Hot Plate*, açık alan (*Open Field*) ve bağlamsal korku koşullanma (*Fear Conditioning*) testlerinin analizlerinde gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal Wallis Varyans analizi ve *post hoc* Dunn testi yapıldı. Analiz için  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi ve *Graphpad Prism 6.0 for Windows* yazılımı kullanıldı.



## BULGULAR

Çalışmamız 2 ayrı deneyden oluşmuştur. Deneyimizin birinci kısmında VPA ile oluşturulan deneysel otizm modelinde ALCAR'ın prenatal koruyucu etkisi üzerinde çalışıldı, ikinci kısımda ise postnatal tedavi edici etkisi araştırıldı.

### DENEY 1: VPA İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL OTİZM MODELİNDE PRENATAL ALCAR'IN ETKİSİ

Deney 1 ve 2'de kullanılan testler; Rotarod, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi (*Three Chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*), *Hot Plate*, açık alan (*Open Field*) ve bağlamsal korku koşullanma (*Fear Conditioning*) testidir ve testler bu sırayla yapılmıştır.

#### Rotarod Testi Verileri

Birinci deneyde; gebe farelere 12,5. günde 600 mg/kg VPA uygulanması sonrası doğan erkek yavru fareler 50 günlük olduklarında ilk test olan rotarod testi ile davranış deneyleri ölçümlerimiz başlamıştır. Salin grubundan başlamak üzere hayvanlar sırasıyla rotarod cihazına yerleştirildiler. Tüm grupların rotarod cihazındaki ölçümleri kaydedildi. 16 rpm hızında dönen silindire konulan deneklerin 180 saniye süreyle hareketleri izlendi, süreyi tamamlayamayan deneklerin düşüş süreleri cihazdaki kronometre baz alınarak kayıt altına alındı.

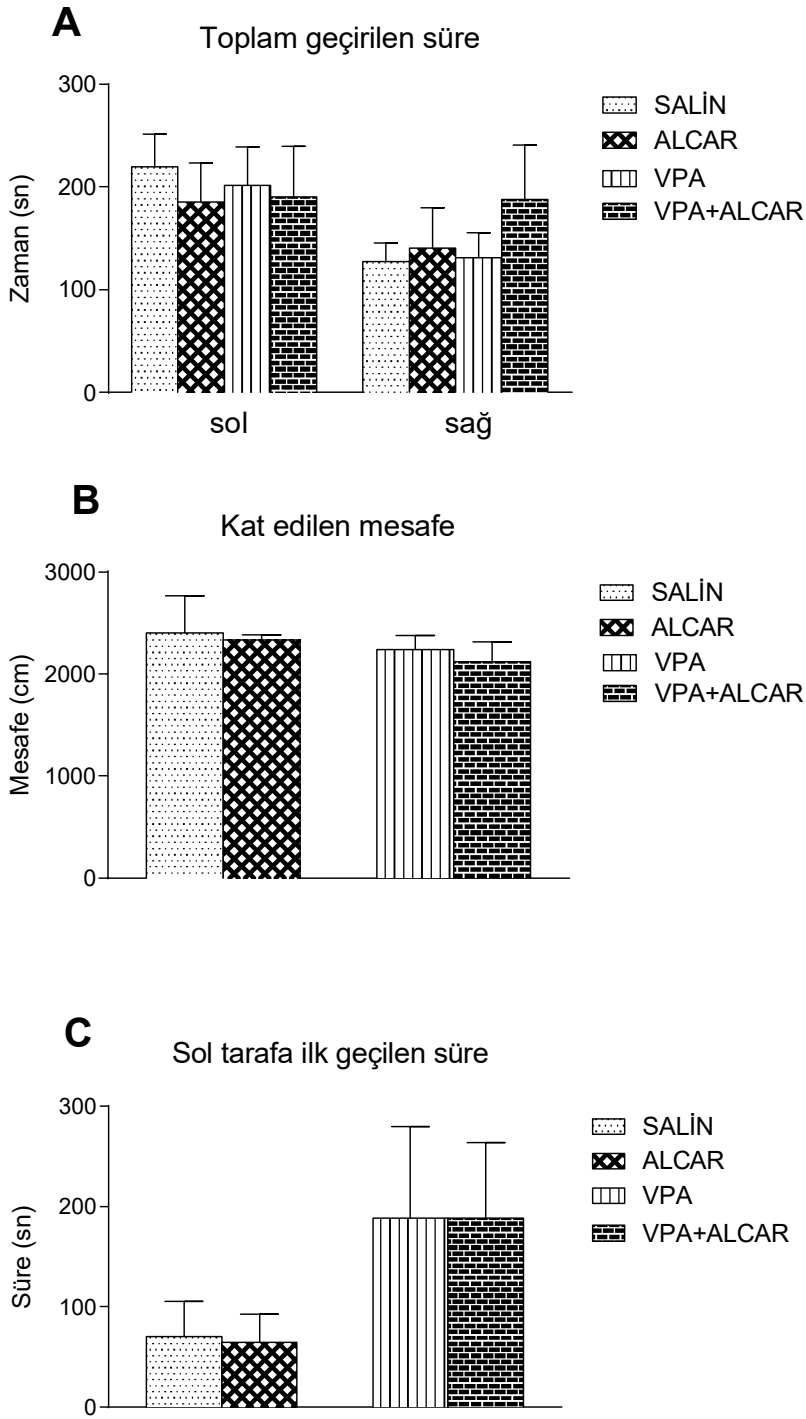
Rotarod testinde salin, VPA, ALCAR ve VPA+ALCAR alan grupların silindirde durabildikleri en uzun süreler incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ve veriler grafik ile gösterilmemiştir.

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

3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin protokolüne göre testten bir gün önce ortama alışması için deneklerin test düzeneğinde serbest dolaşım yapması gerektiğinden, rotarod testinden sonra denekler sırasıyla 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik test düzeneğine konuldular. Bu aşamada herhangi bir kayıt ya da ölçüm yapılmadı. Test düzeneğindeki kafes ve odaları ayıran perdeler konulmadı. Denek düzeneğin her yerinde gezebilecek durumdaydı. 2. gün test sırasıyla tüm gruplara yapıldı.

3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ilk 10 dakikası sosyallik parametrelerini değerlendirmek için kullanılır. Deneyin bu bölümünde sol taraftaki kafesin içine denekle aynı yaşlarda ve cinsiyette bir başka fare konulur. Deneğin, kafesteki hayvanın olduğu tarafta ya da boş kafesin olduğu tarafta geçirdiği süre deney hayvanın sosyalleşmesini göstermede kullanılır. Prenatal uygulanan ALCAR'ın etkisini incelediğimiz gruplarda, gruplar arasında deneklerin sağ/sol tarafta geçirdikleri süre ve sol tarafa ilk geçilen süre açısından istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (sırasıyla  $p=0,4724$ ;  $p=0,4553$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 7).

Toplam kat edilen mesafe deneklerin hem lokomotor aktiviteleri hem de sosyallikleri hakkında yorum yapmaya faydalı olan bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Deney 1'de toplam kat edilen mesafe açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=7875$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 7).



**Şekil 7. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi birinci bölüm (deney 1). A) Sol ve sağ tarafta toplam geçirilen süre B) Toplam kat edilen mesafe C) Sol tarafa ilk geçilen süre**

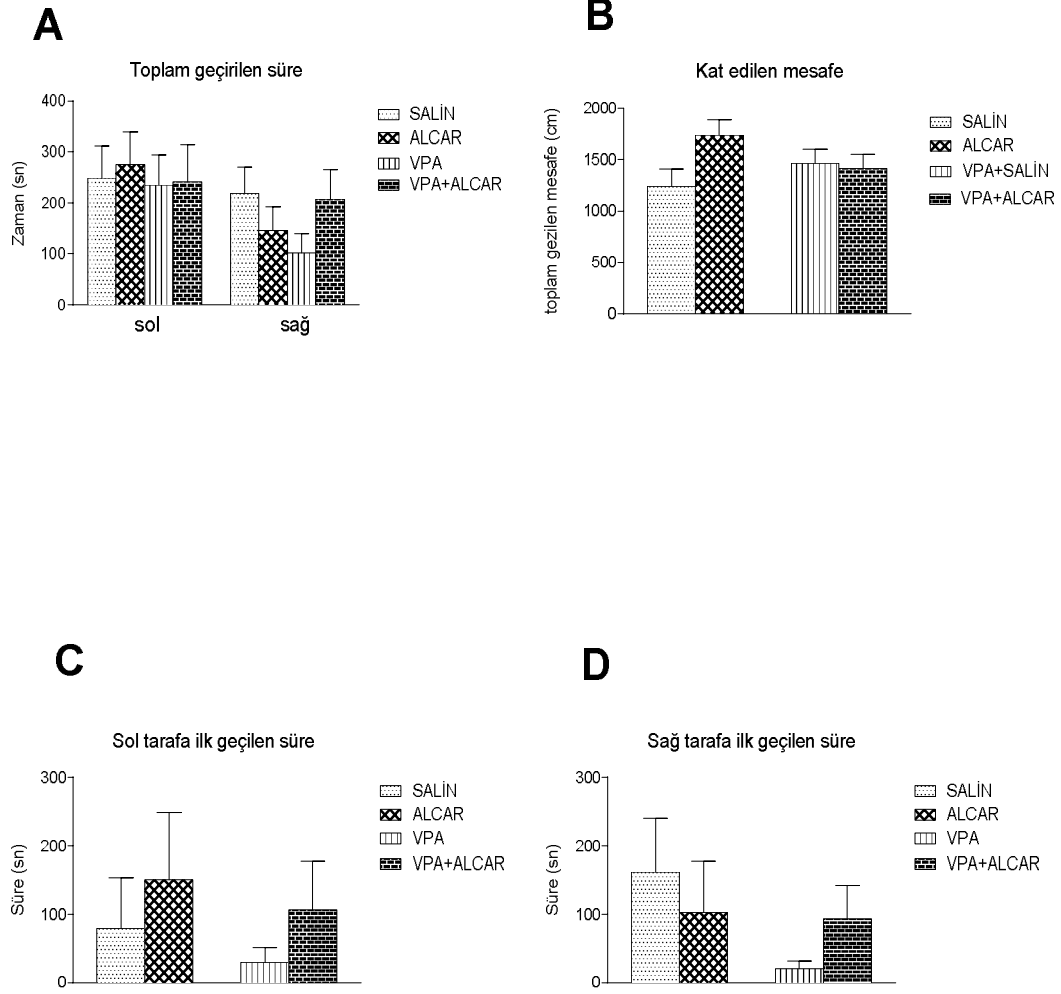
(n=8, Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ikinci 10 dakikalık bölümünde birinci bölümde kafes içinde bulunan deney hayvanı sağ tarafa alınır ve sol tarafa kafes içine yeni bir hayvan yerleştirilir. Böylece düzenekte sağ tarafta denek için tanıdık bir deney hayvanı varken sol tarafta yeni bir deney hayvanı olmuş olur. Deneyin bu bölümünde elde edilen veriler sosyal yeniliklere uyum şeklinde yorumlanabilir.

Prenatal dönemde uygulanan ALCAR'ın etkisini incelediğimiz gruplarda tanıdık (sağ taraf) ve yeni hayvanların (sol taraf) yanında geçirdiği süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,3886$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 8).

Tanıdık hayvanın yanına (sağ taraf) ilk geçilen süre açısından bakıldığında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p=0,5913$  Kruskal Wallis Varyans analizi). Benzer şekilde yeni deney hayvanının yanına (sol taraf) geçilen ilk sürede de gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,5086$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 8).

Tüm gruplar toplam kat edilen mesafe açısından da değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p=0,2411$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 8).



**Şekil 8. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi ikinci bölüm (deney 1). A) Sol ve sağ tarafta toplam geçirilen süre B) Toplam gezilen mesafe C) Sol tarafa ilk geçilen süre D) Sağ tarafa ilk geçilen süre**

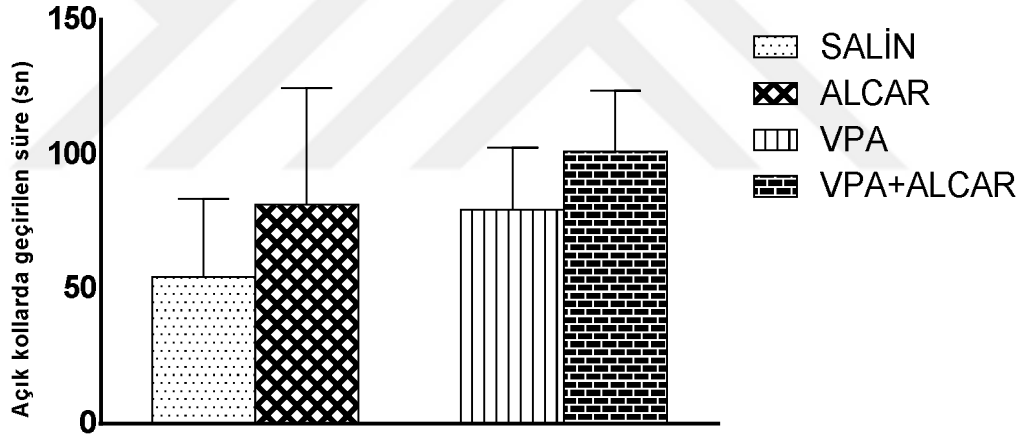
(n=8, Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



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

3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinden sonra, ertesi gün tüm gruplar yükseltilmiş artı labirent testine tabi tutulmuşlardır. Test her denek için 5 dakikalık tek bir kayıttan oluşmuştur. Boş bir odada yer alan düzende denek düzeneğin ortasına bırakıldığında kayıt başlamıştır. Kronometre ile yapılan 5 dakikalık ölçümden sonra kayıt durdurulup fare düzenden alınmıştır. Bu testte toplam gezilen mesafeler ve açık kollarda geçirilen süre analiz edilmiştir.

Prenatal dönemde ALCAR etkisini incelediğimiz gruplarda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süre açısından değerlendirildiğinde 12,5. günde VPA ve 10-14. günlerde ALCAR alan grupta salin grubuna karşı, istatistiksel anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,0299$  Kruskal Wallis Varyans analizi). VPA grubunda salin grubuna göre açık kollarda geçirilen süre artsa da bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 9).



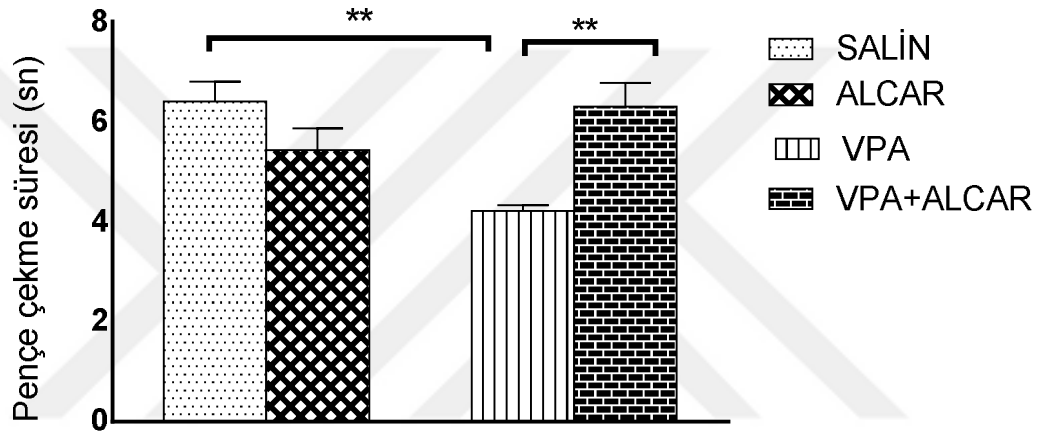
Şekil 9. Yükseltilmiş artı labirent testi açık kollarda geçirilen süre (deney 1)

( $n=8$ ,  $*p < 0,05$  salin grubuna karşı. Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Hot plate Testi Verileri

Bu test düzeneğinde tüm grupların ağrılı uyarana verecekleri yanıt analiz edildi. Denekler sırasıyla 55°C'ye ısıtılmış plakaya bırakıldılar. Pençe çekme süreleri hot plate cihazı üzerinde yer alan kronometre ile ölçüldü. Deneklerin ısıtılmış plaka üzerinde ağrıya verdikleri yanıtlar el ile kaydedildi. Deney için *cut off* değeri 25 saniye olarak belirlendi.

Deney 1'de incelediğimiz gruplarda, deneklerin sıcak plaka üzerinde pençe çekme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,0016$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 10).



Şekil 10. Hot plate testi pençe çekme süreleri (deney 1)

( $n=8$ ,  $**p < 0,05$  salin grubuna karşı VPA grubu ve VPA grubuna karşı VPA+ALCAR grubu Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

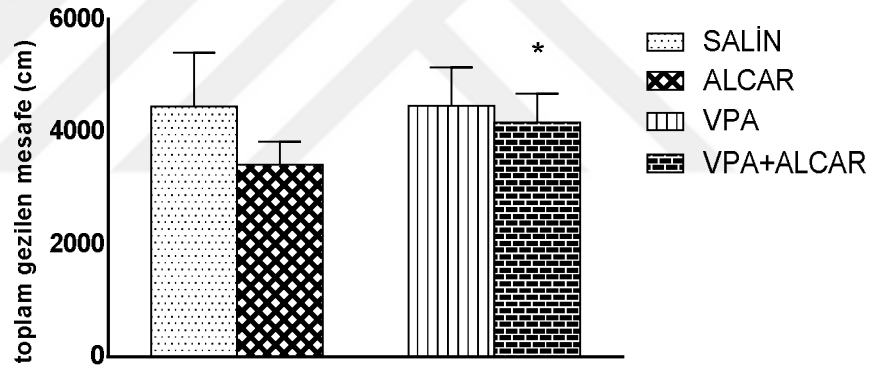
Deney grupları hot plate testi verileri açısından karşılaştırıldığında, kontrol grubu (salin) ile VPA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu bize prenatal 12,5. günde VPA'ya maruz kalmanın ağrı eşikini düşürdüğünü göstermektedir. VPA uygulanan grup ile prenatal dönemde VPA ve ALCAR tedavisi uygulanan grup karşılaştırıldığında ise; 10-14. günler arası prenatal ALCAR uygulanmasının yavru farelerde pençe çekme süresinin artışına neden olmasıyla, ağrı eşikini artırdığını ve bunun istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu gösterdi ( $p < 0,05$ ).

### Açık Alan (Open Field) Testi Verileri

Bir gün sonra tüm gruplara sırasıyla açık alan testi yapıldı. Test boş ve sessiz bir oda içerisinde her bir denek için 10 dakikalık kayıt alınarak gerçekleştirildi. Test, denek düzeneğin ortasına bırakıldıktan sonra başladı.

Lokomotor aktivite ve anksiyetenin incelendiği bu testte ortaya çıkan verileri 3 başlık altında inceledik. Bunlar, toplam gezilen mesafeler, *rearing* sayısı ve merkezde geçirilen süredir.

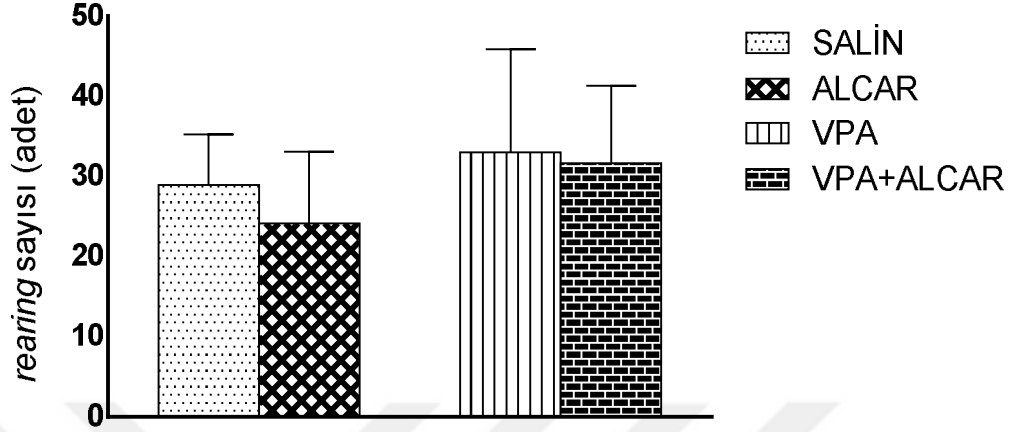
Toplam gezilen mesafe açısından değerlendirdiğimizde 12,5 günde VPA ve 10-14. günlerde ALCAR alan grupta sadece ALCAR alan gruba karşı, istatistiksel anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,0217$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 11).



Şekil 11. Açık alan testi toplam gezilen mesafeler (deney 1)

( $n=8$ ,  $*p < 0,05$  ALCAR grubuna karşı. Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

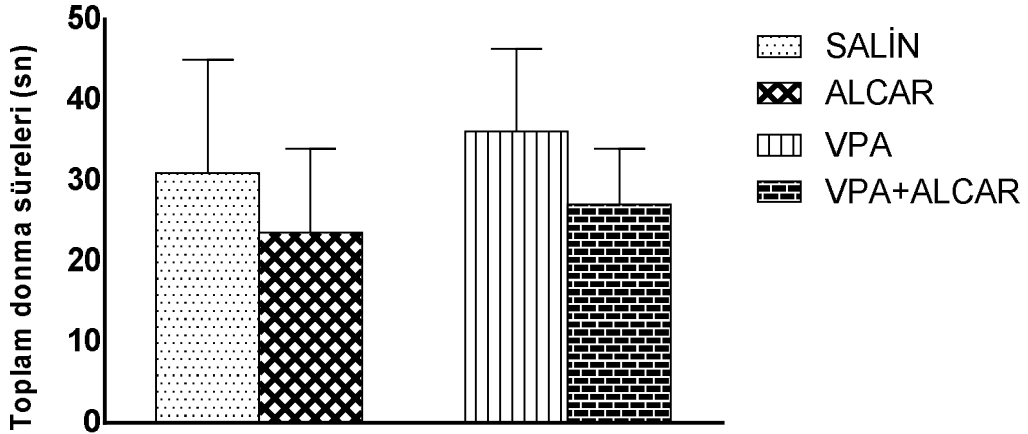
*Rearing* sayısı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,3451$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 12).



**Şekil 12. Açık alan testi rearing sayısı (deney 1)**

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Toplam merkezde geçirilen süreler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0,1801$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 13).



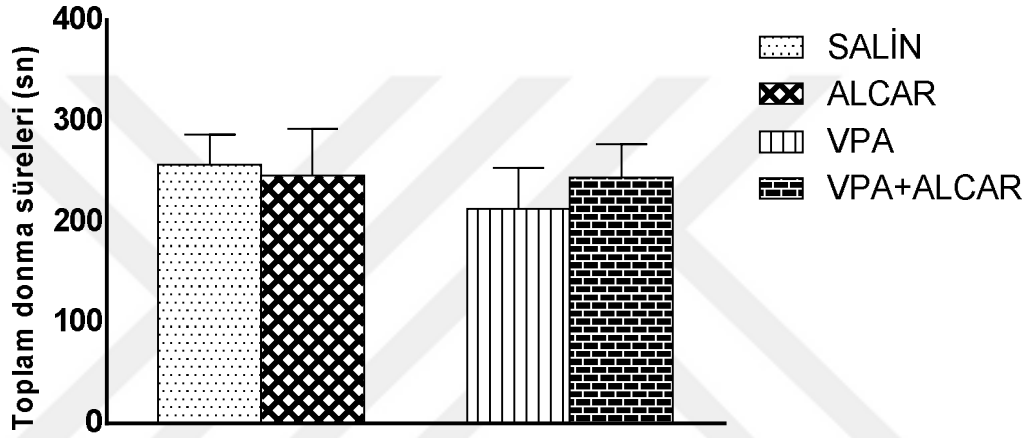
**Şekil 13. Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre (deney 1)**

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Bağlamsal Korku Koşullanma (Fear Condition) Testi Verileri

Deneyin son davranış testi bağlamsal korku koşullanma testidir. Deney ilk gün 7 dakikalık şok verme ve ikinci gün 5 dakikalık değerlendirme kısmından oluşmaktadır. İlk gün 7 dakikalık deneyin 2, 4 ve 6. dakikalarında cihaz içerisinde deneğe şok verilmiştir. İkinci gün ise şok verilmeden 5 dakika cihaz içerisinde tutulmuştur.

Gruplar toplam donma süresi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0,1881$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 14).

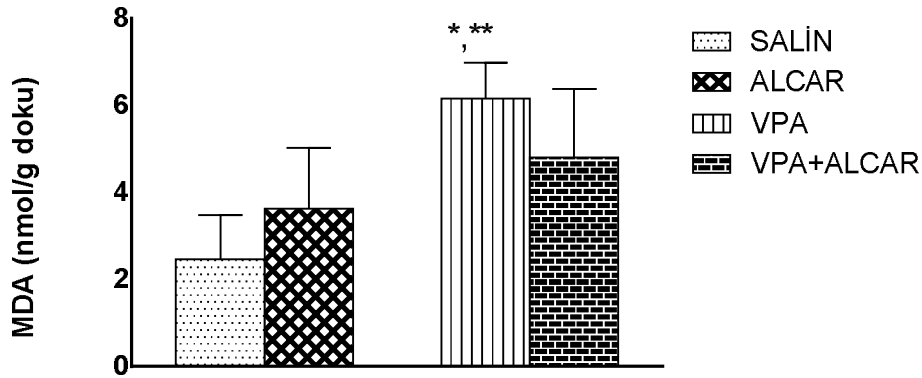


Şekil 14. Bağlamsal korku koşullanma testi toplam donma süreleri (deney 1)

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Beyin Dokularında Malondialdehit Düzeyi Ölçüm Verileri

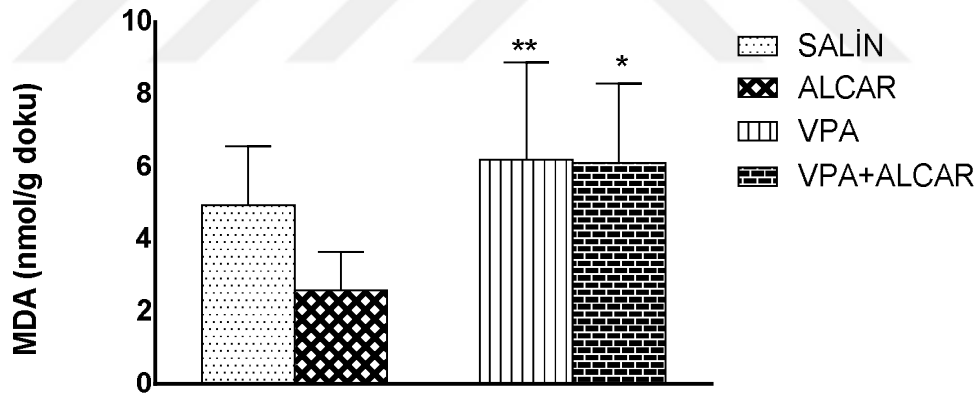
Deney 1'de gruplar karşılaştırıldığında; beyin sol hemisferlerindeki MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ( $p=0,0004$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 15). Prenatal VPA'ya maruz kalma sol hemisfer beyin dokularında oksidatif stres göstergesi olan MDA'nın yükselmesine neden olmuştur.



**Şekil 15. Sol hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 1)**

(n=8, \*p <0,05 , ALCAR grubuna karşı VPA grubu; \*\* p < 0,001, salin grubuna karşı VPA grubu; Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Sağ hemisferlerde yapılan ölçümlerde de VPA alan gruplarda sadece ALCAR alan gruba göre istatistiksel anlamlı artış vardı (p=0,0035, Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 16).



**Şekil 16. Sağ hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 1)**

(n=8, \*p <0,05 , \*\* p < 0,01, ALCAR grubuna karşı Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

## DENEY 2: VPA İLE OLUŞTURULAN DENEYSSEL OTİZM MODELİNDE POSTNATAL ALCAR'IN ETKİSİ

Deney 2'de gebe farelere G12,5. günde VPA uygulanması ile oluşturulan deneysel otizm modelinde ALCAR'ın postnatal etkisi incelenmiştir. Deney 1'de yapılan tüm davranış deneyleri ve beyin dokularında MDA ölçümü aynı sırayla yapılmıştır. Prenatal 12,5. günde

VPA'ya veya saline maruz kalmış gruba sonraki 47. ve 51. günler arasında 5 gün boyunca salin ya da ALCAR enjeksiyonu yapılmıştır.

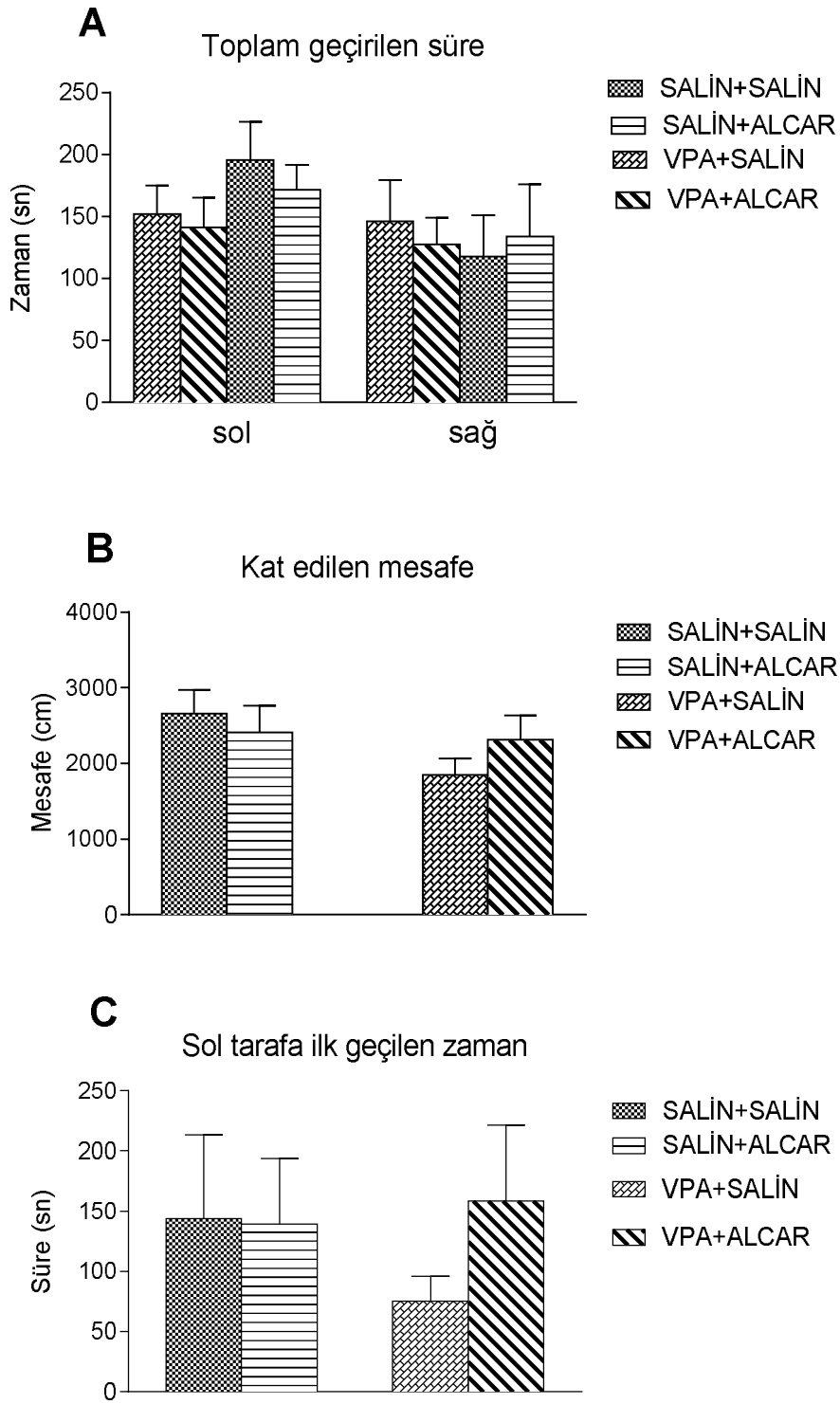
### **Rotarod Testi Verileri**

Rotarod testi Deney 2 için de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı için grafiğe aktarılmamıştır.

### **Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi Verileri**

Postnatal dönemde uygulanan ALCAR'ın etkisini incelediğimiz gruplarda, gruplar arasında deneklerin sağ/sol tarafta geçirdikleri toplam süre ve sol tarafa ilk geçilen süre açısından istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (sırasıyla  $p=0,4303$ ;  $p=0,9922$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 17).

Toplam kat edilen mesafe açısından değerlendirdiğimizde postnatal ALCAR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.



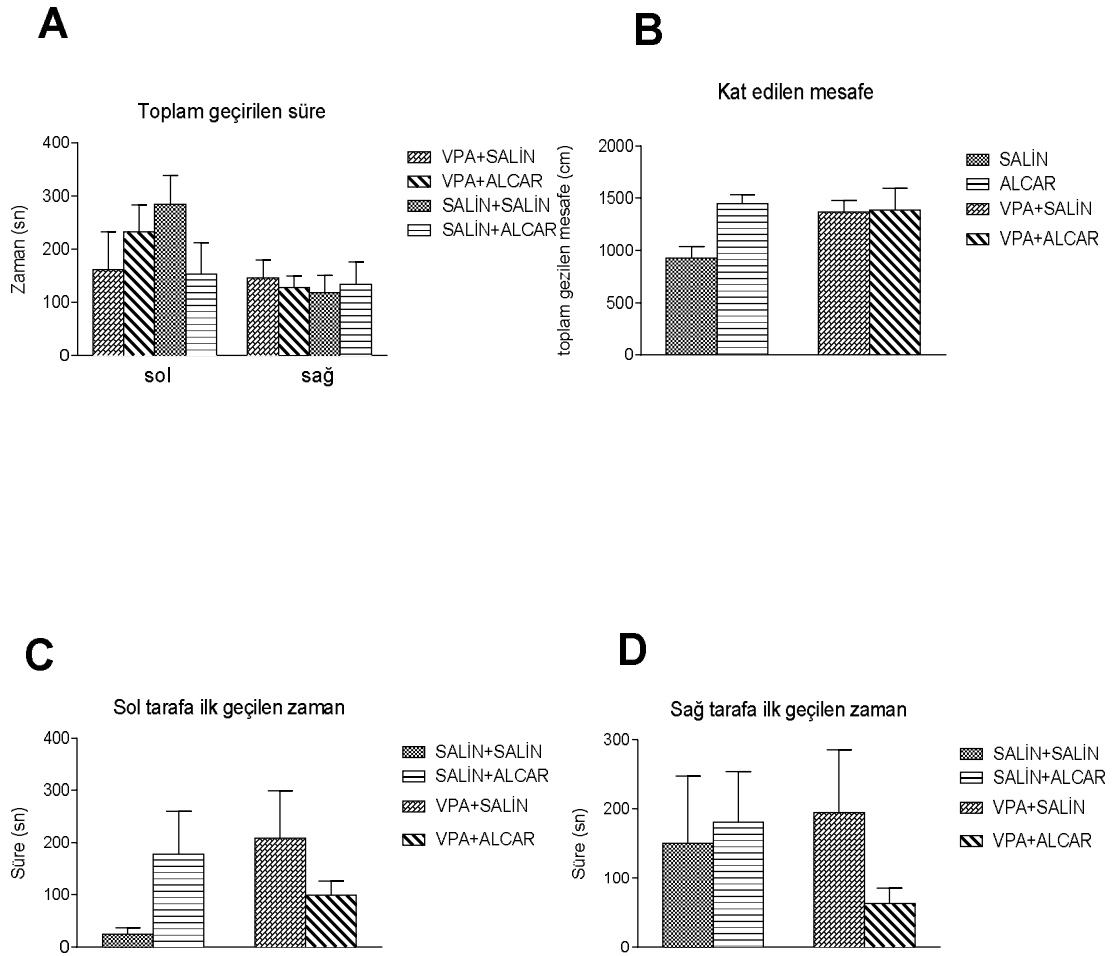
**Şekil 17. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi birinci bölüm (deney 2). A) Sol ve sağ tarafta toplam geçirilen süre B) Toplam kat edilen mesafe C) Sol tarafa ilk geçilen süre**

(n=8, Kruskal Wallis Varyans analizi post hoc Dunn testi.Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



Deneyin ikinci 10 dakikalık bölümünde postnatal ALCAR etkisi, sol ve sağ tarafta toplam geçirilen süreler ve toplam kat edilen mesafeler karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Sol odaya ve sağ odaya ilk geçiş zamanı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla  $p=0,1940$ ,  $p=0,1269$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 18).

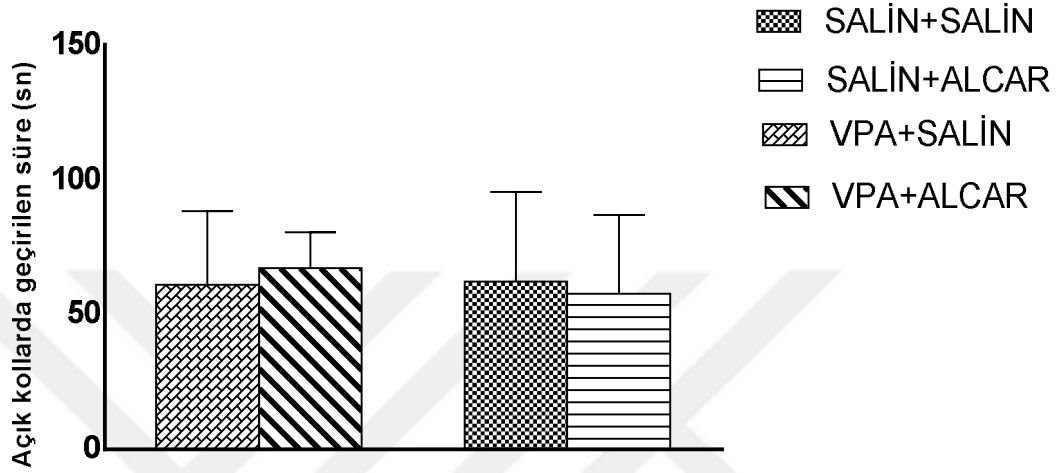


**Şekil 18. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi ikinci bölüm (deney 2). A) Sol ve sağ tarafta toplam geçirilen süre B) Toplam gezilen mesafe C) Sol tarafa ilk geçilen süre D) Sağ tarafa ilk geçilen süre**

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi..Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

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

Açık kollarda geçirilen süre için bakıldığında, istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ( $p=0,8549$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 19).

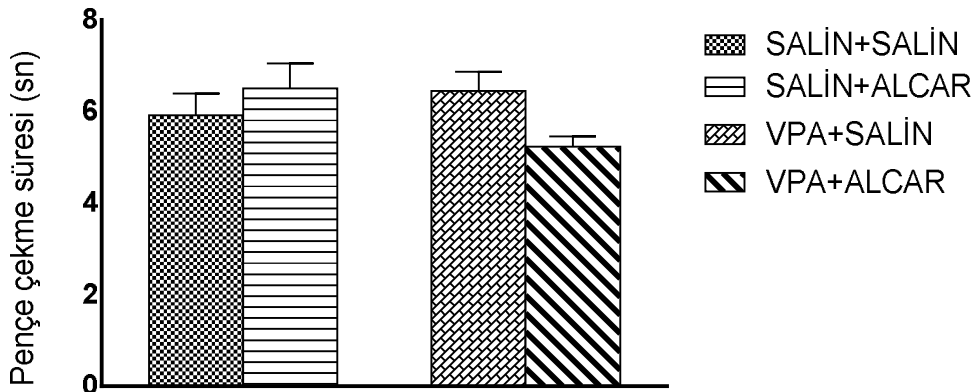


Şekil 19. Yükseltilmiş artı labirent testi açık kollarda geçirilen süreler (deney 2)

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Hot Plate Testi Verileri

Postnatal ALCAR alan grupların sıcak tabakadan ayaklarını kaldırma süreleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,2038$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 20).

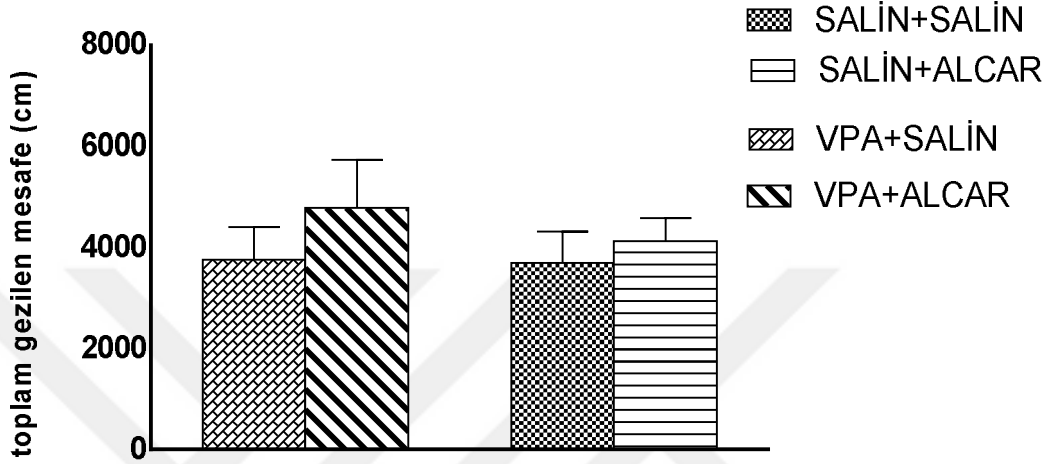


Şekil 20. Hot plate testi pençe çekme süreleri (deney 2)

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Açık Alan (Open Field) Testi Verileri

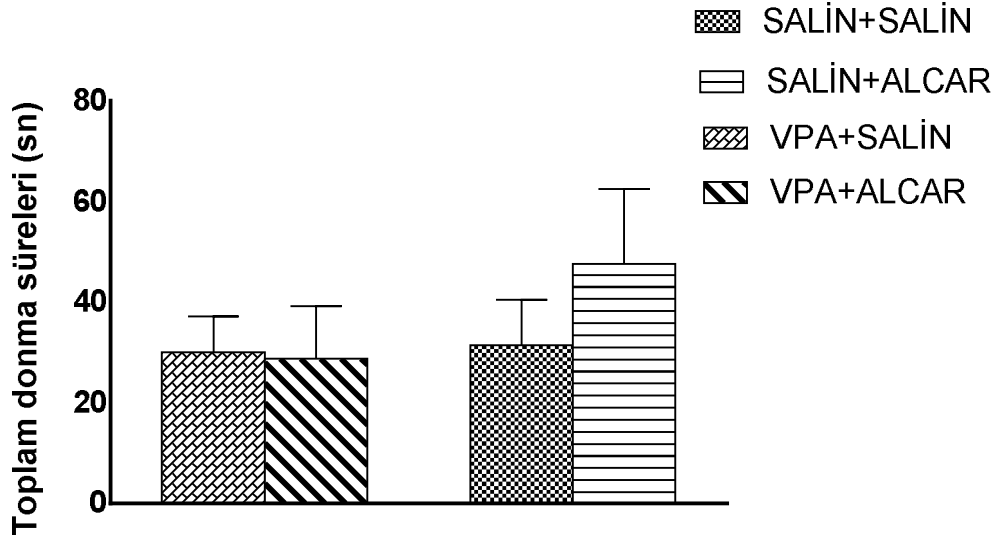
Toplam gezilen mesafe açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 21).



Şekil 21. Açık alan testi toplam gezilen mesafeler (deney 2)

(n=8, Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

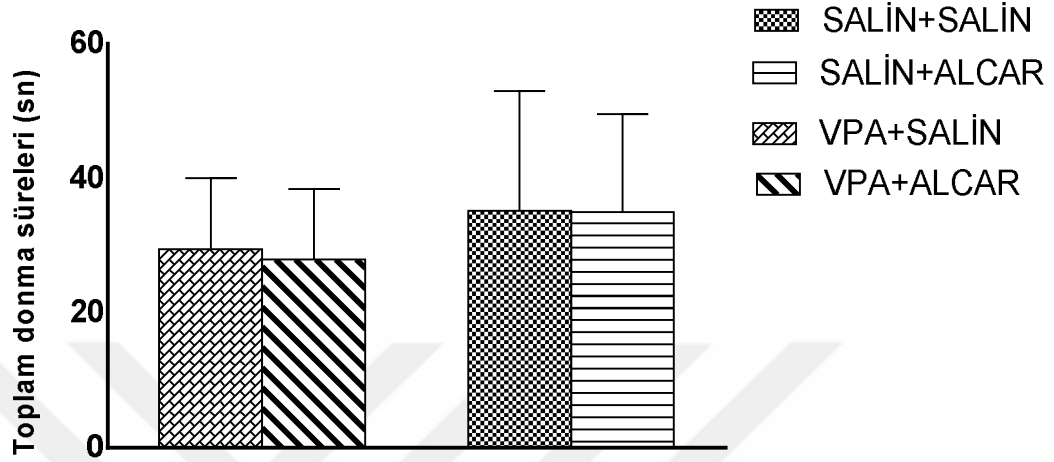
Postnatal ALCAR gruplarında *rearing* sayıları açısından istatistiksel anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 22).



Şekil 22. Açık alan testi rearing sayıları (deney 2)

(n=8, Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Deneklerin merkezde geçirdikleri toplam süreler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0.6695$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 23).

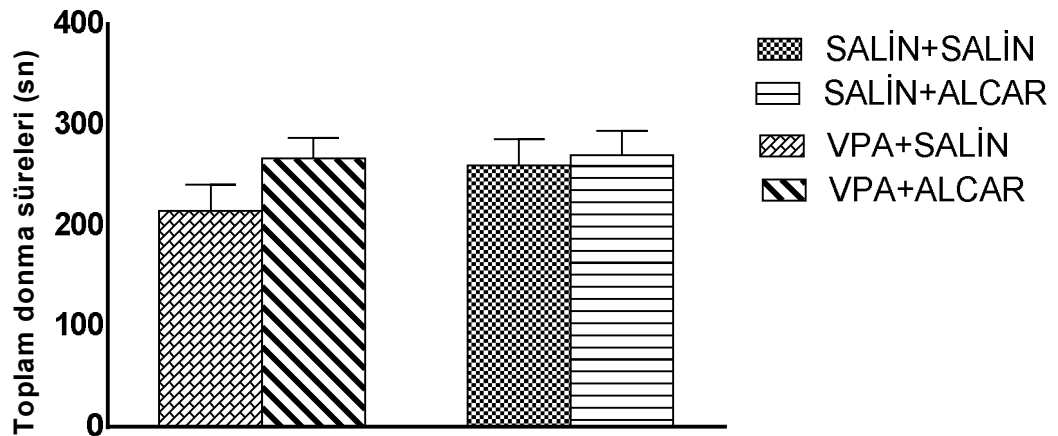


Şekil 23. Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre verileri (deney 2)

( $n=8$ , Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

#### Bağlamsal Korku Koşullanma (Fear Condition) Testi Verileri

Toplam donma süreleri incelendiğinde, salin+ALCAR grubunda VPA+salin grubuna karşı ve VPA+ALCAR grubunda VPA+salin grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü (sırasıyla  $p<0,01$ ,  $p<0,05$  Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 25).



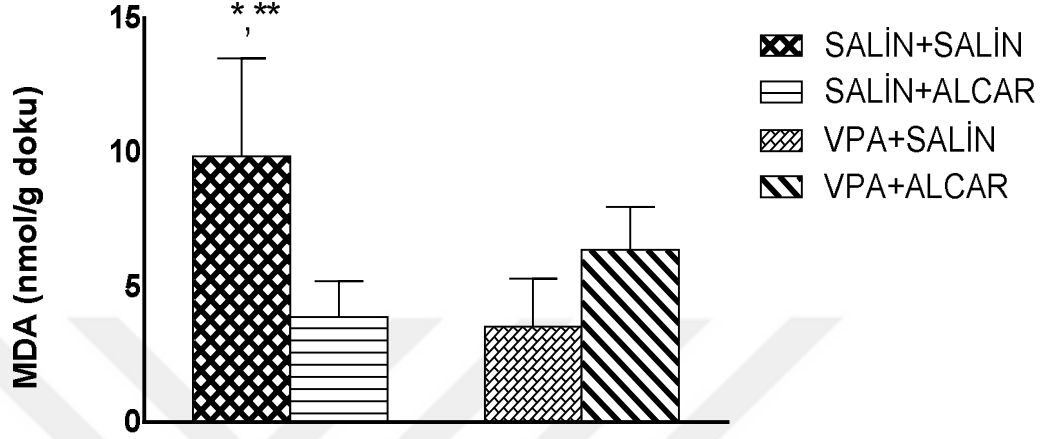
Şekil 24. Bağlamsal korku koşullanma testi toplam donma süreleri (deney 2)

( $n=8$ , \* $p < 0,05$  VPA+salin grubuna karşı; \*\*  $p < 0,01$  VPA+ALCAR grubuna karşı).

Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

### Beyin Dokularında Malondialdehit Düzeyi Verileri

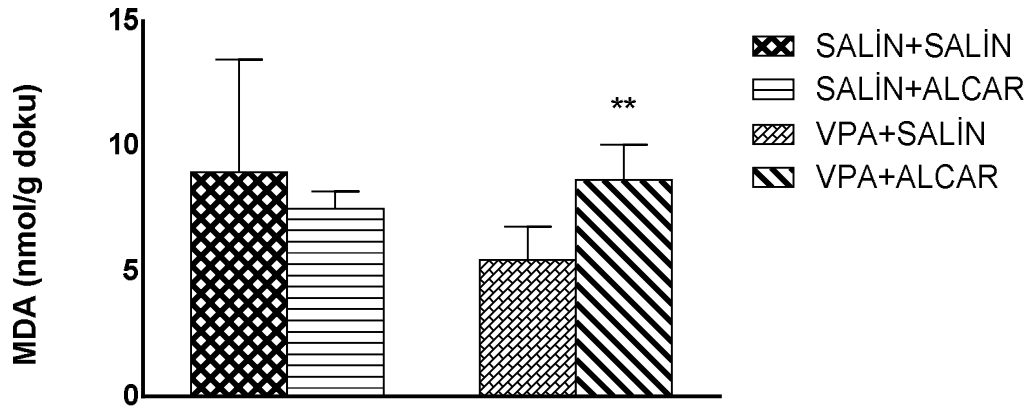
Deney 2’de tüm gruplar karşılaştırıldığında sol hemisferlerde MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ( $p=0,0010$ , Kruskal Wallis Varyans analizi) (Şekil 25).



Şekil 25. Sol hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 2)

( $n=8$ , \* $p < 0,05$ : salin+ALCAR grubuna karşı \*\*  $p < 0,01$ : VPA+ALCAR grubuna karşı Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

Sağ hemisferler de MDA düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark vardı ( $p=0,0082$ ) (Şekil 26).



Şekil 26. Sağ hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 2)

( $n=8$ , \*\* $p < 0,01$ : VPA+salin grubuna karşı Kruskal Wallis Varyans analizi *post hoc* Dunn testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

## TARTIŞMA

Otizm spektrum bozukluğu; sosyal etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde anormallik, ilgi ve etkinliklerde sınırlılık, kısıtlı ve tekrarlayıcı davranışlarla karakterize ve erken çocukluk döneminde belirtilerin ortaya çıktığı nörogelişimsel bir bozukluk ve özel eğitim kategorisidir. Bunların dışında otizme eşlik eden diğer davranışsal sorunlar; yoğun ilgi odaklanması ve stereotipik hareketler, günlük rutinelere aşırı bağlılık, çevrede meydana gelen ve rutinlerde meydana gelen değişikliklere karşı direnç, kendine ve çevresine zarar verme ve duyuşal uyarılara gösterilen olağandışı tepkilerdir. Ayrıca OSB ile dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu da %1-5 oranında birbirlerine eşlik edebilmektedirler. Bu hastalıkla ilişkili olarak tıbbi ve sosyal platformlarda farkındalığın artması olumlu bir gelişme olmakla birlikte henüz istenilen düzeylere ulaşılamamıştır (1).

Otizm benzeri davranış kalıpları ilk kez 1943'te Amerikalı psikiyatrist Leo Kanner tarafından tanımlanmasına rağmen, otizmle ilgili en kapsamlı bilgiler ve gelişmeler 1980'ler sonrasındadır. Amerika'da OSB'nin görülme sıklığı; 1980'li yıllarda her 10 000 kişide 5, 2014 yılı başlarındaki makalelerde ve Hastalıkların Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi'nin raporuna göre her 68 çocukta 1 düzeylerine çıktığı belirtilmiş iken, son yayınlarda her 36 çocuktan birinde görüldüğü belirtilmektedir (14). Otizm erkek çocuklarda, kızlardan 5 kat fazla görülmektedir (12). Deneysel otizm modelleriyle yapılan çalışmalar ile ilgili literatürler incelendiğinde her iki cinsiyetin birlikte (67,68) ya da tek başlarına kullanıldığı (2) çalışmalar olmasına rağmen erkek deneklerin kullanıldığı çalışmalar (2) daha fazladır. Bu nedenle biz de çalışmamızda prenatal dönemde 12,5. günde VPA'ya maruz kalan gebe annelerden doğan erkek yavru fareleri çalışmamıza dahil ettik.

Otizm spektrum bozukluğunun ortaya çıkmasında ağırlıklı rolü genetik etmenler oynamakla birlikte, bozukluğun tek başına genetik faktörlerle açıklanamaması ve hastalıkla ilişkili tek bir genin bulunamaması, çevresel toksinlere maruziyet, gastrointestinal fonksiyonlarda bozukluk, otoimmunité ve ailesel özellikler gibi etkenlerin hastalığın ortaya çıkmasında rolü olabileceği varsayımlarının doğmasına neden olmuştur. Ayrıca, “*leaky gut*” yani bağırsakların normalden daha geçirgen olması otistik çocuklarda %76-88 sıklıkla gözlenmektedir (13). Otistik çocukların %30’u epilepsi hastasıdır ve epilepsi hastası bir gebenin çocuğu otistik olabilmektedir. Buna annede nöbetten kaynaklanan fiziki sorunların ve VPA gibi kullandığı antiepileptik ilaçların sebep olabileceği yönünde yayınlar bulunmaktadır (4).

Otizimde karşılaşılan davranış problemlerinin üstesinden gelmek, çocuğun zihinsel işlevlerini desteklemek amacı ile bugüne kadar birçok ilaç denenmiş ve bir çoğu da otizdeki birtakım sorunlara sınırlı derecede yararlı olmuştur. Otizmin toplumda görülme sıklığının giderek artması, etiyojisinin tam açıklanamaması ve medikal tedavisinin bulunamaması; araştırmacıları deneysel hayvan modellerine yönlendirmiştir. Gebeliğin erken dönemlerinde çevresel kimyasallar ve ilaçlar gibi teratojenlere maruz kalma otizme neden olabilmektedir. Gebeliklerinde antiepileptik bir ilaç olan VPA kullanan insanlardan doğan çocuklarda nöral tüp defektleri ve de motor ve kognitif bozukluklarla karakterize; dil ve iletişim bozuklukları, streotipik davranışlar, hipereksitabilite, davranışsal gelişmede gecikme gibi otizm benzeri davranışlar görülmekte ve bu durum “Fetal Valproat Sendromu” olarak tanımlanmaktadır (16,17). Üstelik VPA’nın gebe hayvanlara uygulanması sonrası doğan yavrularda otizme benzer davranış bozukluklarına ve santral sinir sisteminde oksidatif stres artışına neden olduğu deneysel olarak pek çok çalışmada gösterilmiş (2,53) ve literatürde yerini almıştır.

Valproik asit nedenli otizm benzeri semptomların mekanizmaları henüz açıklığa kavuşmamasına rağmen; prelinik çalışmalar folik asit metabolizması, histon deasetilasyonu, oksidatif stres, sinaptik plastisite ve nöronal apoptosis üzerine etkileri olduğu yönündedir. VPA, epigenetik etkilere sahiptir. Asıl etkisini santral sinir sistemi üzerinde oluşturur. İnsanda birçok değişik nöbet tiplerinde antikonvülzan etki göstermektedir. Valproat üzerinde yapılan deneysel ve klinik çalışmalar iki tip antikonvülzan etkinin olduğunu öne sürmektedir. Birincisi, valproatın plazma ve beyindeki konsantrasyonlarına bağlı direkt farmakolojik etkidir. İkincisi ise muhtemel doğrudan membran etkilerine veya nörotransmitterlerin değişimlerine veya beyinde bulunan valproatın

metabolitlerine bağı olduğu gözükten dolaylı etkidir. Bu hipotez genellikle valproat kullanımından sonra beyinde GABA konsantrasyonunun artmasına bağlanmıştır (18).

Asetil-L-karnitin; L-karnitinin bir esteridir ve karnitinin reversibl asetilasyonu beyinde sentezlenir. Beyine iyi dağılım gösterir ve beyinde pek çok etkiye sahiptir. Asıl rolü mitokondriyada yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ve ATP oluşumu yani enerji metabolizmasıdır. Pek çok çalışmada L-karnitin ve ALCAR'ın beyinde nörodejeneratif ve yaşlanmaya bağı durumlarda oksidatif stres üzerine etkisiyle nöroprotektif ve güçlü antioksidan etkisi olduğu kanıtlanmıştır (19,20). Özellikle nöronların erken gelişim evrelerinde ALCAR uygulanmasının beyinde reaktif oksijen türevleri oluşumunu azalttığı, nörodejenerasyondan koruduğu ve inhalasyon anestezi ilaçlarına bağı sıçan kortikal nöronlarında oluşan nörotoksisiteyi önlediği (21) gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda VPA'ya maruz kalmış gebe farelerden doğan yavrularda oluşturulan deneysel otizm modelinde ALCAR'ın etkisini incelemeyi amaçladık. Yaptığımız literatür taramasında anne karnında VPA'ya maruz kalan farelerin insanlarda görülen otizme benzer davranışlara neden olduğunun kabul edilmesi ve erkek farelerde VPA nedenli deneysel otizm modeli ile yapılmış birçok çalışma olması nedeniyle deneylerimizde; VPA ve deney hayvanı olarak da erkek fare kullanmaya karar verdik. Bu çalışmamız literatürde deneysel otizm modelinde ALCAR tedavisinin etkisinin incelendiği ilk çalışma olacaktır.

Valproik asit ile deneysel otizm konusunda birçok çalışma yapılmış, farklı deney hayvanları (fare, sıçan), farklı cinsiyetler ve değışen dozlarla (350, 500, 600 mg/kg) otizm modeli oluşturulmaya çalışılmış ve bunların etkileri değıerlendirilmiştir (2). Schneider ve Przewlocki'nin 2005 yılında yaptığı çalışma incelendiğinde, Wistar cinsi sıçanlara 600 mg/kg dozunda G12,5. günde VPA kullanılmıştır. Oluşturulan modelde sıçanlarda sosyal keşif sayısı, keşif faaliyetleri ve ağrıya karşı duyarlılık azalmıştır (69).

Markram ve ark. (70) 2008 yılında yaptıkları deneyde ise Wistar cinsi sıçanlar kullanılmış ve 500 mg/kg dozunda G12,5. günde VPA uygulanmıştır. Sonuçlar değıerlendirildiğinde; sosyal keşifte azalma, sosyal etkileşimden kaçınma ve termal ağrıya karşı duyarlılıkta azalma görülmüştür.

500 mg/kg G12,5. günde VPA uygulanan ICR (CD1) cinsi farelerde yapılan çalışmada VPA'nın etkisine bakıldığında lokomotor aktivitenin zayıfladığı, sosyal etkileşimin azaldığı, keşif aktivitesinin azaldığı ve anksiyetenin arttığı görülmüştür (71).

Farklı doz ve günde uygulanan VPA'nın etkisine bakıldığında Katoka ve ark. 2013 yılında yaptığı çalışmada, ICR (CD1) cinsi farelere 300 mg/kg G10. günde VPA



uygulanmıştır. Bu çalışmada farelerde sosyal etkileşimin azaldığı ve tekrarlı kazma hareketinin varlığı görülmüştür (72).

Valproik asit ile oluşturulan deneysel otizm modellerinde genellikle; insandaki otizmde karakterize olan tekrarlı davranışlar, sosyal etkileşim ve sosyal yenilikte isteksizlik, lokomotor aktivitede bozulma, yenilik keşfinde isteksizlik, acı ve ağrıya duyarsızlık, anksiyete artışı ve benzeri durumlar görülebilmektedir, fakat bazı çalışmalarda otizmin oluşturulmadığı ya da test edilen sosyal davranış deneylerinde farklı sonuçların çıktığı da görülebilmektedir (71-73,74).

Deneyimizde sosyallik ve sosyal yeniliği incelediğimiz 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi verilerine bakıldığında kontrol grubu (salin) ve VPA ile oluşturduğumuz otizm modeli grubundaki fareler arasında sosyallik açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmadı. Gözlemsel olarak daha pasif ve asosyal duran VPA uygulanan grup, istatistiksel olarak salin grubundan farklı değerlendirilemedi. Yabancı farelere olan yaklaşımlar, kafese yaklaşma, merkezdeki boş odadan yabancı farenin bulunduğu odaya geçme süresi, koklama, sabit durma gibi eylemler VPA'lı grupta gözlemsel olarak farklı olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlandırılmadı.

Anksiyetenin incelendiği yükseltilmiş artı labirent test düzeneğinde toplam gezilen mesafeler ve açık kolda geçirilen süreler karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve VPA ile oluşturulan modelin yer aldığı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Ağrıya duyarlılıkları açısından oluşturduğumuz VPA modelini salin (kontrol) grubuyla karşılaştırdığımızda, otizm modelini oluşturduğumuz grubun ağrı eşiği kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Hot plate testinde ağrıya verilen tepki süresi VPA ile oluşturulan modelde daha kısadır. Ağrıya aşırı duyarsızlık ya da normalden düşük ağrı eşiği otizm ile de karakterizedir (75).

Anksiyetenin ve lokomotor aktivitenin incelendiği bir diğer test düzeneği ise açık alan testidir. Fareler kendileri için güvenli olan alanı bulma ve ilk kez buldukları ortamı keşfetme davranışları sergilerler. VPA ile oluşturulan modellerde tekrarlanan ve kalıplaşmış davranışların arttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (69). VPA'ya maruz kalmış farelerde artmış hiperaktivite açık alan testi ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76). Açık alan testinde toplam gezilen mesafeler farelerin anksiyete ve keşif durumlarını anlamlandırır. Bizim yaptığımız çalışmada kontrol grubu (salin) ve VPA'ya maruz kalan grup-incelendiğinde, otizm modeli ve kontrol grubu arasında bir fark oluşmadı.

Bağlamsal korku koşullanma testi farelerde öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan bir metottur. Banerjee ve ark. (76) yaptığı çalışmada VPA

uygulanan deneklerin korku koşullanma yeteneklerinin kontrol gruplarına kıyasla azaldığını belirtmiştir. Biz de çalışmamızda bağlamsal korku koşullanma test düzeneğinde farelerin toplam donma sayılarını karşılaştırdık. VPA ile otizm modeli oluşturduğumuz gruptaki fareler, kontrol grubuna (salin) kıyasla daha az donma eylemi gerçekleştirmiştir. Bu durum otizm modelinin, kontrol grubuna kıyasla öğrenme eyleminde daha zayıf olduğunu gösterir. Bir gün önce maruz kalınan şokun öğrenilmesi ve hatırlanması durumu, prenatal dönemde VPA'ya maruz kalan farelerde daha zayıf bulunmuştur. Sonuçlarımız Banerjee ve ark. (76) yaptığı çalışma ile benzerdir.

ALCAR eksikliği mitokondriyal kopya sayısının azalmasına neden olmaktadır (77). Otistik çocuklarda düşük ALCAR düzeyi olduğu yapılan bazı çalışmalarda ifade edilmiştir (78-79). Prenatal ALCAR etkisini incelediğimizde sosyallik ve sosyal yenilik açısından deneyimizde ALCAR'ın fareler üzerinde bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süre ve açık kollara giriş sayıları, anksiyete durumunun ifade edilmesinde kullanılan verilerdir (71). Prenatal ALCAR etkisini yükseltilmiş artı labirent test düzeneğinde incelediğimizde, VPA+ALCAR alan grubun salin alan kontrol grubuna karşı açık kolda geçirdiği süre istatistiksel olarak daha fazladır. Markram ve ark. (71) 2008'de yaptığı çalışmada da bahsedildiği gibi VPA ile oluşturulan otizm modelinde anksiyetede artış görülmüştür. ALCAR'ın anksiyeteyi düşürdüğü yapılan çalışmalarla sıçanlarda gösterilmiştir. Levine ve ark.(80)'nın 2005 yılında yaptıkları çalışmada ALCAR'ın 50 ve 75 mg/kg olan dozlarının anksiyete benzeri davranışları azalttığı bildirilmektedir. Çalışmamızda G12,5. gün VPA ya maruz kalan 10-14. günlerinde ALCAR alan grupta yer alan fareler VPA'nın etkisi olarak beklediğimiz anksiyete davranışlarını göstermemiştir. Bu durumun aksine ALCAR'ın etkisi olarak azalmış anksiyete görülmüştür. Bu durum çalışmamızda ALCAR'ın anksiyeteyi azalttığını göstermektedir.

Hot plate testi deney hayvanlarında ağrıya olan duyarlılığının incelendiği bir yöntemdir. Otistik bireylerde ağrıya duyarsızlık ve artmış ağrı eşiği beklenen durumdur (81). Otistik bireylerde sadece ağrı eşiğinin yükselmesi değil düşmesi de beklenen durumlar arasındadır (75). ALCAR'ın ağrı eşiğini arttırdığı da çalışmalarda gösterilmiştir (82). Çalışmamızda hot plate testi sonuçlarına göre salin grubuna kıyasla VPA uygulanan grupta pençe çekme süresi daha kısadır. Bu durum otistik bireylerde görülen düşük ağrı eşiği ile benzer bir sonuçtur. VPA+ALCAR uygulanan grup ve VPA uygulanan grup karşılaştırıldığında, VPA+ALCAR uygulanan grupta pençe çekme süresi daha geçtir. Bu durum ALCAR'ın ağrı eşiğini arttırdığının gösterildiği çalışmalar ile uyumludur (83).

Lokomotor aktivitenin incelendiği açık alan testinde, çalışmamız ile aynı dozda VPA (600 mg/kg) uygulanarak yapılan bir çalışmada lokomotor aktivitenin arttığı gösterilmiştir (2). ALCAR'ın lokomotor aktivite üzerine olan etkisine baktığımızda VPA'ya benzer şekilde lokomotor aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (83). Sonuçlara paralel olarak bizim çalışmamızda da ALCAR+VPA uygulanan grubun ALCAR uygulanan gruba göre artmış lokomotor aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Hem ALCAR hem de VPA'nın lokomotor aktiviteyi arttırdığını gösteren çalışmalar bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyuşmaktadır.

Oksidatif stres belirteçlerinden olan MDA'nın otistik bireylerde yükseldiği bilinmektedir. Otizmde oksidatif stresi inceleyen çalışmalarda MDA'nın yüksek olduğu gösterilmiştir (81). Çalışmamızda VPA uygulanan grubun beyin dokularında kontrol (salin) grubuna kıyasla daha yüksek MDA bulunmuştur. ALCAR uygulanan grubun beyin dokularındaki MDA miktarı VPA uygulanan gruba göre daha azdır. Çalışmamızda prenatal uygulanan ALCAR'ın oksidatif stresi azalttığı görüldü.

İkinci deneyimizde; postnatal ALCAR etkisini incelediğimiz gruplarda, ALCAR'ın belleği güçlendirdiği görülmüştür. Salin+ALCAR uygulanan grupta VPA+salin uygulanan gruba karşı bağlamsal korku koşullanma testinde sürenin arttığı görüldü. VPA+ALCAR grubunda da VPA+salin grubuna karşı artmış donma süresi görüldü. VPA ile oluşturulan modelde postnatal uygulanan ALCAR'ın bağlamsal korku koşullanma testinde belleği arttırıcı etkisi olduğu görüldü.

Beyin dokularındaki MDA miktarı incelendiğinde, sol hemisferde postnatal uygulanan ALCAR'ın oksidatif stres belirteci olan MDA'nın seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Salin+salin uygulanan kontrol grubuna kıyasla salin+ALCAR uygulanan grubun beyin dokularındaki MDA miktarı düşük bulunmuştur. VPA+ALCAR uygulanan gruba kıyasla salin+salin uygulaması yapılan grubun beyin MDA miktarı daha fazladır. Bu durum prenatal salin ve prenatal VPA uygulanan gruplara postnatal ALCAR tedavisi uygulandığında beyin dokularındaki MDA seviyesinin azaldığını gösterdi. Çalışmamızda ALCAR'ın oksidatif stresi azaltıcı etkisi görüldü. Sağ hemisfer içinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Diğer davranış testlerinde postnatal uygulanan ALCAR'ın tedavi edici etkisi yönünde bulguya rastlanamamıştır.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda, gebeliğinin 12,5. gününde VPA'ya maruz kalan dişilerden doğan erkek farelerde ALCAR etkisinin araştırılması amacıyla iki deney planlandı. Gebe annelere ALCAR uygulaması yaptığımız birinci deneyde prenatal dönemde ALCAR'ın fetüs üzerinde VPA'nın otizm oluşturmamasını engelleyici etkisi, postnatal dönemde uygulama yaptığımız ikinci deneyde ise anne karnında VPA'ya maruziyet sonrası doğan yavru farelerde ALCAR'ın otizmi tedavi edici etkisi incelendi. Her 2 deneydeki yavru fareler 50 günlük olduklarında sırasıyla rotarod, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik (*Three Chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*), Hot Plate, açık alan (*Open Field*) ve bağlamsal korku koşullanma (*Fear Conditioning*) testleri uygulandı.

Deney 1'de:

- 1- Yükseltilmiş artı labirent testinde VPA+ALCAR uygulanan grubun salin grubuna göre açık kollarda geçirdiği süre daha uzundu.
- 2- Hot plate testinde VPA uygulanan grubun pençe çekme süresi salin grubuna karşı daha kısaydı.
- 3- Bağlamsal korku koşullanma testinde VPA uygulanan grup salin grubuna göre daha az donma süresine sahipti.
- 4- Yükseltilmiş artı labirent testinde VPA+ALCAR alan grubun açık kollarda geçirdiği süre kontrol grubuna göre daha fazlaydı.
- 5- Hot plate testinde VPA+ALCAR uygulanan grubun pençe çekme süresi VPA uygulanan gruptan daha uzundu.
- 6- Açık alan testinde ALCAR alan grubun lokomotor aktivitesi VPA alan gruba göre artmıştı.

7- VPA uygulanan grubun beyin dokularındaki MDA düzeyi salin grubuna göre daha fazlaydı.

8- ALCAR uygulanan grubun beyin dokularındaki MDA düzeyi VPA grubuna göre daha azdı.

Deney 2'de:

9- Bağlamsal korku koşullanma testinde Salin+ALCAR uygulanan grubun donma süreleri VPA+salin uygulanan gruba göre artmıştı.

10- Bağlamsal korku koşullanma testinde VPA+ALCAR uygulanan grupta donma süreleri VPA+ salin uygulanan gruba göre artmıştı.

11- Salin+salin grubunun beyin MDA düzeyi salin+ALCAR grubuna göre fazlaydı.

12- Salin+salin grubunun beyin MDA düzeyi VPA+ALCAR grubuna göre fazlaydı.

## ÖZET

Çalışmamızda, gebeliğinin 12,5. gününde valproik aside maruz kalan dişilerden doğan erkek farelerde asetil-L-karnitin etkisinin incelemesi amacıyla iki deney planlandı ve 64 Balb/c fare, her deneyde 4 grup ve 8'er hayvan olacak şekilde ayrıldı.

Deney 1'de gebe anneye asetil-L-karnitin uygulanmasının yavru farelerde otizm oluşumunu engellemesini araştırmak üzere; 1. gruba 12,5. gün salin, 2. gruba 12,5. gün valproik asit, 3. gruba 10-14. günler arası asetil-L-karnitin, 4. gruba 10-14. günler arasında asetil-L-karnitin ve 12,5. günde valproik asit uygulandı.

Deney 2'de ise anne karnında valproik aside maruziyet sonrası doğan yavrulara asetil-L-karnitin uygulanmasının tedavi edici etkisini araştırmak üzere; 1. grupta 12,5. günde salin uygulanmış annelerden doğan erkek yavru farelere 47-51. günler arası salin, 2. grupta 12,5. günde salin uygulanmış annelerden doğan farelere 47-51. günler arası asetil-L-karnitin, 3. grupta 12,5. günde valproik asit uygulanmış annelerden doğan farelere 47-51. günler arası salin ve 4. grupta 12,5. günde valproik asit uygulanmış annelerden doğan farelere 47-51. günler arası asetil-L-karnitin verildi.

Deneyleerde salin 10 mg/kg, valproik asit 600 ml/kg, asetil-L-karnitin 100 ml/kg ve intraperitoneal verilmiştir. Yavrular 50 günlük olduklarında sırasıyla *rotarod*, 3 odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi (*Three Chamber*), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*), *hot plate*, açık alan (*Open Field*) ve bağlamsal korku koşullanma (*Fear Conditioning*) testleri uygulandı.

Deney 1'de prenatal asetil-L-karnitinin otizmde görülen davranış bozuklukları üzerine engelleyici etkisi bulunamazken, hot plate testinde antinosiseptif etkisi görülmüştür ( $p=0,0016$ ). Deney 2'de asetil-L-karnitinin valproik asit nedenli otizm üzerine tedavi edici etkisi bulunamamıştır.

Sonuçlarımız asetil-L-karnitinin valproik asit-nedenli otizm üzerine koruyucu ya da tedavi edici etkisinin bulunmadığını, fakat antinosiseptif etkisinin olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Otizm spektrum bozukluğu, valproik asit, asetil-L-karnitin, davranış testleri, oksidatif stres



# **THE EFFECT OF ACETYL-L-CARNITINE IN THE EXPERIMENTAL VALPROIC ACID-INDUCED AUTISM MODEL**

## **SUMMARY**

In our study, two experiments were planned with the aim of examining the acetyl-L-carnitine effect in male mice born after G12,5 valproic acid exposure. 64 Balb/c mice were divided into 4 groups (n:8 for each group). In Experiment 1, we investigated whether the administration of acetyl-L-carnitine to pregnant mice prevented autism formation in young mice. The 1st group was administered saline on day 12,5. Group 2 was administered VPA on 12,5 day. Group 3 was treated with ALCAR between days 10-14 and ALCAR was administered between days 10-14 in group 4 and VPA injection day 12,5. In Experiment 2, to investigate the therapeutic effect of acetyl-L-carnitine in infants born after valproic acid exposure in the uterus, in maternal-born male offspring, group 1 was injected with valproic acid and on day 12,5 and saline injected postnatal on days 47-51. We injected valproic acid on day 12,5 and they were treated with acetyl-L-carnitine in days 47-51. In group 3, we injected saline on day 12,5 and on days 47-51. In Group 4, saline was administered on day 12,5 and acetyl-L-carnitine was given on days 47-51.

Saline, valproic acid and acetyl-L-carnitine were given intraperitoneally at doses of 10 mg/kg, 600 mg/kg and 100 mg/kg respectively. Rotarod, 3 room social and social innovation test (Three Chamber), plus maze, hot plate, open field and fear conditioning tests were applied for 50 days.



In Experiment 1, antinociceptive effect of prenatal acetyl-L-carnitine was observed in the hot plate test ( $p = 0.0016$ ), although there was no inhibitory effect on behavioral disorder in autism. In Experiment 2, there was no therapeutic effect of acetyl-L-carnitine on valproic acid-induced autism.

Our results suggest that acetyl-L-carnitine does not have a protective or therapeutic effect on autism caused by valproic acid, but may have antinociceptive effect.

**Key words:** autism spectrum bozukluğu, valproic acid, asetil-L-carnitine, behavioral tests, oxidative stress



## KAYNAKLAR

1. Kumar H, Sharma B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res.* 2016;1630:83-97.
2. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-included rodent model of autism. *Exp Neurol.* 2018; 299(Pt A):217-27.
3. Ida-Eto M, Hara N, Ohkawara T, Narita M. Mechanism of auditory hypersensitivity in human autism using autism model rats. *Pediatr Int.* 2017;59(4):404-7.
4. Varlinskaya EI, Mooney SM. Acute exposure to ethanol on gestational day 15 affects social motivation of female offspring. *Behav Brain Res.* 2014;261:106-9.
5. Langguth M. et al. No effect of prenatal vitamin D deficiency on autism-relevant behaviours in multiple inbred strains of mice. *Behav Brain Res.* 2018;348:42-52.
6. Stohn JP, Martinez ME, Zafer M, López-Espíndola D, Keyes LM, Hernandez A. Increased aggression and lack of maternal behavior in Dio3-deficient mice associated with abnormalities in oxytocin and vasopressin systems. *Genes Brain Behav.* 2018;17(1):23-35.
7. Durieux A, Fernandes C, Murphy D, Labouesse M, Giovanoli S, Meyer U. et al. Targeting glia with n-acetylcysteine modulates brain glutamate and behaviors relevant to neurodevelopmental disorders in C57BL/6J Mice *Front Behav Neurosci.* 2015;9:343.
8. Yau SY, Bettio L, Vetrici M, Truesdell A, Chiu C, Chiu J et al. Chronic minocycline treatment improves hippocampal neuronal structure, NMDA receptor function, and memory processing in Fmr1 knockout mice. *Neurobiol Dis.* 2018;113:11-22.

9. Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, Zaman F, Mahmud Reza H. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. *Behav Brain Res.* 2015;286:112-2.
10. Gao J, Wang X, Sun H, Cao Y, Liang S, Wang H. et al. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid (DHA) on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid (VPA)-induced rat autism model. *Int J Dev Neurosci.* 2016;49:67-78.
11. Khongrum J, Wattanathorn J. Laser Acupuncture at HT7 Improves the Cerebellar Disorders in Valproic Acid-Rat Model of Autism. *J Acupunct Meridian Stud.* 2017;10(4):231-39.
12. İftar E. Otizm spektrum bozukluğu olan çocuklar ve eğitimleri. Ankara: Ayrıntı Basımevi, 2012.
13. Autism Spectrum Disorder. National Institutes of Mental Health (NIHM). erişim tarihi: Mart 2018 <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/autism-spectrum-disorders-asd/index.shtml>
14. Autism rates now 1 in 36 , 1 in 28 for boys. *Embracing Imperfect.* erişim tarihi: Aralık 2017. <https://embracingimperfect.com/autism/autism-rates-now-1-36-1-28-boys/>
15. Monteiro SA, Spinks-Franklin A, Treadwell-Deering D, Berry L, Sellers-Vinson S, Smith E, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Children Referred for Diagnostic Autism Evaluation. *Clin Pediatr (Phila).* 2015;54(14):1322-7.
16. Lai MC, Lombardo MV, Auyeung B, Chakrabarti B, Baron-Cohen S. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2015;54:11–24.
17. Beggiano A, Peyre H, Maruani A, Scheid I, Rastam M, Amsellem F. et al. Gender differences in autism spectrum disorders: Divergence among specific core symptoms. *Autism Res,* 2016;10.1002/aur.1715.
18. de Theije CG, Koelink PJ, Korte-Bouws GA, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B. Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2014;37:240-7.
19. Lord C, Cook EH, Leventhal BL, Amaral DG. Autism Spectrum Disorders. *Neuron.* 2000;28, 355-63.
20. Ozer E, Ozdemir S. Face processing and eye tracking skills in children with autism spectrum disorders. *Int-Jecse,* 2015;7(1):1-23.

21. Boukhris T, Sheehy O, Mottron L, Bérard A. Antidepressant Use During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorder in Children. *Jama Pediatr.* 2016;170(2):117-24.
22. Travers, B. G., Tromp, D. P., Adluru, N., Lange, N., Destiche, D., Ennis, C., et al. Atypical development of white matter microstructure of the corpus callosum in males with autism: a longitudinal investigation. *Molecular Autism*, 2015;6(1), 1-15.
23. Tan B, Zou Y, Zhang Y, Zhang R, Ou J, Shen Y. et al. A novel de novo POGZ mutation in a patient with intellectual disability. *J Hum Genet.* 2016;61(4):357-9.
24. McCanlies EC, Fekedulegn D, Mnatsakanova A, Burchfiel CM, Sanderson WT, Charles LE., et al. Parental occupational exposures and autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord.* 2012;42(11):2323-34.
25. Rose DR, Yang H, Serena G, Sturgeon C, Ma B, Careaga M. et al. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav Immun.* 2018;70:354-68.
26. Garofoli F, Lombardi G, Orcesi S, Pisoni C, Mazzucchelli I, Angelini M et al. An Italian Prospective Experience on the Association Between Congenital Cytomegalovirus Infection and Autistic Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord.* 2017;47(5):1490-5.
27. Sven S., Paul L., Ralf H., Henrik L., Christina H, Abraham R., The Familial Risk of Autism. *Jama.* 2014; 311(17): 1770-7.
28. Kensuke M., Takanobu N., Kazuki N., Nanaka N., Atsushi K., Atsuko T. De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *Journal of Molecular Psychiatry* 2016;4:1.
29. Servadio M, Manduca A, Melancia F, Leboffe L, Schiavi S, Campolongo P. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2018;28(1):85-96.
30. Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Harrison NL. The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacol Ther.* 2009;124(3):324-35.
31. Christianson AL, Chesler N, Kromberg JG. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Dev Med Child Neurol.* 1994;36(4):361-9.
32. Baltz T, de Lima AD, Voigt T. Contribution of GABAergic interneurons to the development of spontaneous activity patterns in cultured neocortical networks. *Front Cell Neurosci.* 2010;21;4:15.

33. Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, Almeida HC, Costa AE. Autism and Möbius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(2A):181-5.
34. Pragnya B, Kameshwari JS, Veeresh B. Ameliorating effect of piperine on behavioral abnormalities and oxidative markers in sodium valproate induced autism in BALB/C mice. *Behav Brain Res.* 2014;270:86-94.
35. Hill DS, Cabrera R, Wallis Schultz D, Zhu H, Lu W, Finnell RH et al. Autism-Like Behavior and Epigenetic Changes Associated with Autism as Consequences of In Utero Exposure to Environmental Pollutants in a Mouse Model. *Behav Neurol.* 2015:426263.
36. Schneider T, Ziolkowska B, Gieryk A, Tyminska A, Przewlocki R. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;193(4):547-55.
37. 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.
38. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA; Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology.* 2008;2;71(23):1923-4.
39. 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.
40. Correia CT, Coutinho AM, Sequeira AF, Sousa IG, Lourenço Venda L, Almeida JP, et al. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav.* 2010;9(7):841-8.
41. Diane R., Patrick V., Sebastian T.t, Denis G., Sylvie C., Christian A. Fetal exposure to teratogens: Evidence of genes involved in autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35:1254-65.
42. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;26;91(9):4082-5.
43. Huang PH, McBride WG. Interaction of [glutarimide-2-14C]-thalidomide with rat embryonic DNA in vivo. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1997;17(1):1-5.

44. D Rice, S Barone, Jr Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:511-33.
45. Ema M, Ise R, Kato H, Oneda S, Hirose A, Hirata-Koizumi M, et al. Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. *Reprod Toxicol.* 2010;29(1):49-56.
46. Narita M, Oyabu A, Imura Y, Kamada N, Yokoyama T, Tano K. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. *Neurosci Res.* 2010;66(1):2-6.
47. Lamy S, Thibaut F. Psychoactive substance use during pregnancy: a review. *Encephale.* 2010;36(1):33-8.
48. Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(6):394-406.
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. Bak SW, Choi H, Park HH, Lee KY, Lee YJ, Yoon MY et al. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine against oxygen-glucose deprivation-induced neural stem cell death. *mol neurobiol.* 2016;53(10):6644-52.
51. Liu F, Rainosek SW, Sadvova N, Fogle CM, Patterson TA, Hanig JP et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on propofol-induced toxicity in embryonic neural stem cells. *Neurotoxicology.* 2014;42:49-57.
52. Beaudet AL. Brain carnitine deficiency causes nonsyndromic autism with an extreme male bias: A hypothesis. *Bioessays.* 2017;39(8):1-11.
53. Assaf N, Shalby AB, Khalil WK, Ahmed HH. Biochemical and genetic alterations of oxidant/antioxidant status of the brain in rats treated with dexamethasone: protective roles of melatonin and acetyl-L-carnitine. *J Physiol Biochem.* 2012;68(1):77-90.
54. Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Doganay L, Turan FN. L-carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol Rep.* 2005;57(4):481-8.
55. Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med (Plovdiv).* 2005;47(1):26-30.
56. Erkin B, Dokmeci D, Altaner S, Turan FN. Gastroprotective effect of L-carnitine on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats: a preliminary study. *Folia Med (Plovdiv).* 2006;48(3-4):86-9.

57. Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, Uz YH. Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(6):611-8.
58. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, Ture M. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol Res.* 2007;56(4):303-10.
59. Sepand MR, Razavi-Azarkhiavi K, Omid A, Zirak MR, Sabzevari S, Kazemi AR, Sabzevari O. Effect of Acetyl-L-Carnitine on Antioxidant Status, Lipid Peroxidation, and Oxidative Damage of Arsenic in Rat. *Biol Trace Elem Res.* 2016;171(1):107-15.
60. Wang X, Wang LP, Tang H, Shan WY, Wang X, Liu D, Wu YY, Tian Q, Wang JZ, Zhu LQ. Acetyl-L-carnitine rescues scopolamine-induced memory deficits by restoring insulin-like growth factor II via decreasing p53 oxidation. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt A:80-7.
61. Li S, Li Q, Li Y, Li L, Tian H, Sun X. Acetyl-L-carnitine in the treatment of peripheral neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119479.
62. Ghelardini C, Galeotti N, Calvani M, Mosconi L, Nicolai R, Bartolini A. Acetyl-l-carnitine induces muscarinic antinociception in mice and rats. *Neuropharmacology.* 2002;43(7):1180-7.
63. Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Calvani M, Nicolai R, Mosconi L, Toscano A, Pacini A, Bartolini A. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on neuropathic pain and apoptosis: a role for the nicotinic receptor. *J Neurosci Res.* 2009;87(1):200-7
64. Sarkar S, Gough B, Raymick J, Beaudoin MA, Ali SF, Virmani A. Histopathological and electrophysiological indices of rotenone-evoked dopaminergic toxicity: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine. *Neurosci Lett.* 2015;606:53-9.
65. Singh S, Mishra A, Shukla S. ALCAR Exerts Neuroprotective and Pro-Neurogenic Effects by Inhibition of Glial Activation and Oxidative Stress via Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Parkinsonian Rats. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4286-301.
66. Md Al Amin, Ishtiaque A C., KMM Mahbub, Mafruhi S., Masum S., Md Ruhul K. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of *Asteracantha longifolia* Nees. *Bangladesh Pharm J.* 2012;15(2):107-20.

67. Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Fernagut PO. Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol*. In press 2018.
68. Acosta J, Campolongo MA, Höcht C, Depino AM, Golombek DA, Agostino PV. Deficits in temporal processing in mice prenatally exposed to Valproic Acid. *Eur J Neurosci*. 2018;47(6):619-630.
69. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-9.
70. 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.
71. 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.
72. Kim J Seung H Kwon K Ko M. Lee E. Oh H. Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *journal pone* 2014.
73. Mehta MV, Gandal MJ, Siegel SJ. mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *Send to PLoS One*. 2011;6(10):e26077.
74. 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;15;68(12):1100-6.
75. Kamen S, Skier J. Dental management of the autistic child. *Spec Care Dentist*. 1985;5(1):20-3.
76. Anwasha B., Jonathan A. L., Anthony H. Aeshah O. S., Jonathan E. P. Overexpression of Homer1a in the basal and lateral amygdala impairs fear conditioning and induces an autism-like social impairment. *Mol Autism*. 2016;7:16.
77. Bouitbir J, Haegler P, Singh F, Joerin L, Felser A, Duthaler U. Impaired Exercise Performance and Skeletal Muscle Mitochondrial Function in Rats with Secondary Carnitine Deficiency. *Front Physiol*. 2016;7:345.
78. Lombard J. Autism: a mitochondrial disorder? *Med Hypotheses*. 1998;50(6):497-500.
79. Filipek PA, Juranek J, Nguyen MT, Cummings C, Gargus JJ. Relative carnitine deficiency in autism. *J Autism Dev Disord*. 2004;34(6):615-23.



80. Levine J, Kaplan Z, Pettegrew JW, McClure RJ, Gershon S, Buriakovsky I, et al. Effect of intraperitoneal acetyl-L-carnitine (ALCAR) on anxiety-like behaviours in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2005;8(1):65-74.
81. Morakotsriwan N, Wattanathorn J, Kirisattayakul W, Chaisiwamongkol K. Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3206561.
82. Galeotti N, Bartolini A, Calvani M, Nicolai R, Ghelardini C. Acetyl-L-carnitine requires phospholipase C-IP3 pathway activation to induce antinociception. *Neuropharmacology.* 2004;47(2):286-94.
83. Ewan EE, Hagg T. Intrathecal Acetyl-L-Carnitine Protects Tissue and Improves Function after a Mild Contusive Spinal Cord Injury in Rats. *J Neurotrauma.* 2016;33(3):269-77.



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### ŞEKİLLER

Şekil 1. Rotarod cihazı.....	15
Şekil 2. Hot plate cihazı.....	16
Şekil 3. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik test düzeneği.....	17
Şekil 4. Açık alan test düzeneği .....	18
Şekil 5. Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği.....	19
Şekil 6. Bağlamsal korku koşullanma test düzeneği .....	20
Şekil 7. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi birinci bölüm (deney 1).....	25
Şekil 8. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi ikinci bölüm (deney 1) .....	27
Şekil 9. Yükseltilmiş artı labirent testi açık kollarda geçirilen süre (deney 1) .....	28
Şekil 10. Hot plate testi pençe çekme süreleri (deney 1).....	29
Şekil 11. Açık alan testi toplam gezilen mesafeler (deney 1).....	30
Şekil 12. Açık alan testi rearing sayısı (deney 1) .....	31
Şekil 13. Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre (deney 1).....	31
Şekil 14. Bağlamsal korku koşullanma testi toplam donma süreleri (deney 1).....	32
Şekil 15. Sol hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 1) .....	33
Şekil 16. Sağ hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 1).....	33
Şekil 17. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi birinci bölüm (deney 2) .....	35
Şekil 18. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi ikinci bölüm (deney 2) .....	36
Şekil 19. Yükseltilmiş artı labirent testi açık kollarda geçirilen süreler (deney 2) .....	37
Şekil 20. Hot plate testi pençe çekme süreleri (deney 2).....	37

<b>Şekil 21.</b> Açık alan testi toplam gezilen mesafeler (deney 2) .....	38
<b>Şekil 22.</b> Açık alan testi rearing sayıları (deney 2).....	38
<b>Şekil 23.</b> Açık alan testi merkez alanda geçirilen süre verileri (deney 2).....	39
<b>Şekil 24.</b> Bağlamsal korku koşullanma testi toplam donma süreleri (deney 2) .....	39
<b>Şekil 25.</b> Sol hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 2) .....	40
<b>Şekil 26.</b> Sağ hemisfer beyin dokularında MDA düzeyleri (deney 2).....	40

## **TABLolar**

<b>Tablo 1.</b> Gruplara uygulanan kimyasallar ve uygulama günleri.....	14
---	----



## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Edirne'nin Havsa ilçesinde doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi Havsa'da tamamladım. Lisans eğitimimi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde tamamlayarak 2014 yılında mezun oldum. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji ve Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Programlarında yüksek lisans eğitimlerime başladım. 2017 yılından beri Trakya Üniversitesi'nde klinik araştırma koordinatörü olarak görev yapmaktayım.

**EKLER**

