

Bir Maternal İmmün Aktivasyon Modelinde Otizm Spektrum Bozukluğu Gruplarında Görülen Davranışsal Varyasyonun Morfolojik İliintileri

Morphological Correlates of Behavioral Variation in Autism Spectrum Disorder Groups in A Maternal Immune Activation Model

Dilek ÜNAL¹ , Aslıhan BAHADIR VAROL² , Tansu Bilge KÖSE² , Emine EREN KOÇAK² 

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nörolojik ve Psikiyatrik Bilimler Enstitüsü, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Klinik heterojenite, Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) nin altında yatan nörobiyolojik mekanizmaları inceleyen araştırmacılar için en büyük zorluklardan biridir. Bu çalışmada Poliinosinik-polisitidilik asit [Poly (I:C)] ile oluşturulan Maternal İmmün Aktivasyon fare modelinde, OSB de görülen davranışsal çeşitlilik ve semptom kümeleriyle ilişkili beyin devrelerinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, yavrulara davranış deneyleri uygulanmış ve medyal prefrontal korteks, hipokampus ve striatumda bölgesel kalınlık histolojik beyin kesitlerinden ölçülmüştür.

Yöntem: Bu çalışmada intraperitoneal Poly (I:C) uygulanmış annelerin yavruları (n: 14) ve fosfat tamponlu salin uygulanmış annelerin yavruları (n: 6) kullanılmıştır. Sosyal davranış bozukluğunu değerlendirmek için üç odalı sosyalizasyon testi ve sosyal bellek testi, stereotipik davranışları değerlendirmek için biye gömme testi, öğrenme ve bilişsel esnekliği

değerlendirmek için ise yeni nesne tanıma testi kullanılmıştır. Davranış testi parametrelerine göre üç alt grup (her biri n: 4) oluşturulmuştur ve medyal prefrontal korteks, hipokampus ve striatumda bölgesel kalınlık ölçümleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Davranış farklılıklarının klinikte beklendiği gibi bir spektrumda dağıldığı ve stereotipik davranış baskın olan Poly (I:C) alt grubunda hipokampus kalınlığının artmış olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Poly (I:C) ile oluşturulan maternal immün aktivasyon modelinde OSB'deki davranışsal varyasyon ve semptom grubu ilişkili bölgesel gelişim farklılığı gözlenmektedir.

Anahtar Sözcükler: OSB, bölgesel kalınlık, sosyal yetersizlik, stereotipik davranış

ABSTRACT

Introduction: Clinical heterogeneity is one of the biggest challenges for researchers studying underlying neurobiological mechanisms in Autism Spectrum Disorder (ASD). We aimed to use polyinosinic-polycytidylic acid [Poly (I:C)] induced maternal immune activation mice model to investigate the behavioral variation and the role of brain circuits related to symptom clusters in ASD. For this purpose, behavioral tests were applied to offspring and regional thickness was measured from histological brain sections in medial prefrontal cortex, hippocampus and striatum.

Methods: Pups of intraperitoneal Poly (I:C)-applied mothers (n: 14) and phosphate buffered saline-applied mothers (n: 6) were used for this study. We used three chamber socialization test and social memory test to evaluate social behavior deficit in mice. Marble burying test was used for assessing stereotypic behavior and new object recognition test for

learning and cognitive flexibility. Three subgroups (n: 4 for each) were determined according to behavioral test parameters. Regional thickness was measured in medial prefrontal cortex, hippocampus and striatum and compared between subgroups.

Results: We detected that the behavioral differences were distributed in a spectrum as expected in the clinic and also detected increased hippocampus thickness in the stereotypic behavior dominant Poly (I:C) subgroup.

Conclusion: Poly (I:C) induced maternal immune activation model creates the behavioral variation and cortical development differences that are seen in relation with symptom groups in ASD.

Keywords: ASD, regional thickness, social deficiency, stereotypic behaviour

Cite this article as: Ünal D, Bahadır Varol A, Köse TB, Eren Koçak E. Bir Maternal İmmün Aktivasyon Modelinde Otizm Spektrum Bozukluğu Gruplarında Görülen Davranışsal Varyasyonun Morfolojik İliintileri. Arch Neuropsychiatry 2024; 61:195–201.

GİRİŞ

Klinik görünümdeki heterojenlik, Otizm spektrum bozukluğu (OSB) etiyojisi çalışmalarında büyük bir zorluktur. OSB'nin bir ucunda bilişsel yetersizliği olan, sürekli denetime ihtiyaç duyan ve ciddi davranış sorunları olan hastalar, diğer ucunda akademik başarıyı yüksek ve bağımsız bir yaşam kurabilen hastalar vardır. Otizm spektrum bozukluğu

tanısının farklı semptom kümelerini içermesi, OSB'nin patofizyolojisinde farklı beyin devrelerinin rol oynadığını düşündürmektedir. Sosyalleşmede bozukluk, farklı hastalarda değişen şiddette, karşılıklılık, sözsüz ve sözlü iletişimdeki eksikliği içeren ana temel semptom kümesidir. Diğer bir semptom kümesi ise basmakalıp hareketler, aynılıkta ısrar, sınırlı ilgi

Öne Çıkan Noktalar

- OSB çalışmalarında klinik heterojenlik ele alınması gereken önemli bir zorluktur.
- MİA modeli semptomlardaki klinik varyasyonu göstermesi açısından uygun bir modeldir.
- Semptom kümeleri, beyin bölgelerindeki morfolojik değişikliklerle ilişkili olabilir.

alanları ve çevrenin duyuşal uyarılarına karşı hipo/aşırı duyarlılık olarak ortaya çıkan kısıtlı ilgi alanı ve tekrarlayıcı davranışlardır. Bilişsel yetersizlik ve buna bağlı öğrenme sorunları da sıklıkla birlikte görülebilmektedir. Semptomlara yönelik kategorik yaklaşım, bozukluğun altında yatan beyin devrelerini ve altta yatan mekanizmaları anlamakta yetersiz kalmıştır.

İnsan çalışmaları OSB hastaları ile sağlıklı kontroller arasındaki morfolojik ve fonksiyonel farklılıkları göstermektedir. Otizm spektrum bozukluğu hastalarında baş çevresinin, beyin hacminin ve bölgesel nöron sayısının arttığı gösterilmiştir (1,2). Postmortem çalışmalarda OSB hastalarının beyin ağırlığının kontrollere göre daha yüksek olduğu, özellikle medial prefrontal korteks ve dorsolateral prefrontal kortekste nöron sayısında ve bölgesel kalınlıkta kontrollere göre anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (2). Neokorteks, entorhinal korteks, cornu ammonis ve dentat girus sosyal etkileşim ve iletişimdeki bozukluklarla ilişkilendirilken, serebellum motor bozukluklar ve koordinasyon güçlükleriyle ilişkili bulunmuştur. Subkortikal, periventriküler, hipokampal ve serebellar bölgelerde anormal nöronal migrasyonun varlığı, OSB'li bireylerde geniş bir yelpazedeki klinik belirtilerle ilişkilendirilmiştir (3). OSB'li bireylerde yapısal ve fonksiyonel nörogörüntüleme çalışmalarını gözden geçiren analizlerde, bazal ganglionların stereotipik davranışlarla ilişkili olduğu (4), ön singulat korteksin ise kendine referanslı işleme ile, medial prefrontal korteks (mPFC) ve posterior singulat korteksin ise zihin teorisi süreçlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (5).

Hayvan çalışmaları da otistik benzeri davranışlar ile bölgesel bölgesel kalınlık arasındaki ilişkiye destek sağlamaktadır. Doğal OSB modeli olarak kabul edilen BTBRT+tf/J farelerin postnatal 7. günde medial prefrontal korteks ve insuladaki bölgesel kalınlığının kontrollere göre arttığı gösterilmiştir (6). Bu sonuçlar da bölgesel nöronların sayısının artışı, sosyal becerileri ve dil becerilerini düzenleyen devrelerin oluşumunu bozabileceğini önermiştir.

Etiyolojik çalışmalar hastalığın altında yatan genetik ve çevresel faktörlerin multipleks etkileşiminin rolünü göstermektedir (7). Doğum öncesi viral enfeksiyon etiyolojik çalışmalarda en çok tekrarlanan bulgulardan biridir (8). Maternal immün aktivasyon (MİA), OSB çalışmalarında en çok çalışılan modellerden biridir ve çevresel etkiyi dozlama, kesin zamanlamayla modelleme avantajına sahiptir (9,10). Ayrıca Poly (I:C) viral enfeksiyonu taklit etme şansına sahiptir ve bölgesel gelişim fareler ile insanlar arasında oldukça benzerdir (11). Poly (I:C) MİA fare modellerinin daha önce otistik davranış, bağışıklık cevabı ve bölgesel gelişim değişikliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12-15).

Bu nedenle, araştırmamızda OSB'de görülen davranışsal çeşitliliği ve OSB'deki semptom kümeleriyle ilgili beyin devrelerinin rolünü araştırmak için Poly (I:C) MİA fare modelini kullanmayı seçtik. Hayvanları davranışsal test parametrelerine göre gruplandırdıktan sonra, farklı semptom kümelerinin bağıntısı olarak hipokampus, medial prefrontal korteks ve striatumdaki bölgesel kalınlığı hesapladık.

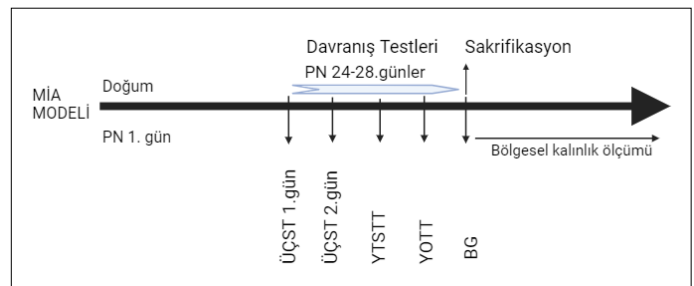
YÖNTEMLER

Hayvanlar

Hacettepe Üniversitesi Nörolojik ve Psikiyatrik Bilimler Enstitüsü'nde daha önce Jackson Lab'dan satın alınan laboratuvar stoğundan yetişkin erkek THY-Ch2-YFP transgenik (12 haftalık) hayvanlar kullanılmıştır. Yetişkin C57BL/6 dişi fareler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan satın alınmıştır. Bu çalışmada 14 Poly (I:C) yavru ve fosfat tamponlu salinli (PBS) yavru kullanılmıştır. Sağlık durumları, yaşları ve kilolarına göre birbirlerinden farksız olan fareler standart koşullar altında tutulmuştur (25±2 °C, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü, suya ve yiyeceğe serbest erişim). Hayvan kullanımına ilişkin tüm prosedürler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/07-02) ve prosedürlerde Ulusal Araştırma Konseyi'nin Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu (8. baskı) (16) takip edilmiştir. Kullanılan hayvan sayısını ve acıyı en aza indirmek için azami çaba sarfedilmiştir.

Çalışma Tasarımı ve Maternal İmmün Aktivasyon (MİA) prosedürü

Doğum öncesi viral enfeksiyon, yavrularda OSB gelişimi için bilinen bir çevresel risk faktörüdür. Sentetik çift sarmallı bir RNA olan Poly (I:C)'nin gebe farelere uygulanması, doğum öncesi viral enfeksiyonları taklit ederek yavrularda OSB benzeri davranışlara neden olur (13). Aileler tek bir erkek Thy-Ch2-YFP fare ve iki dişi C57BL/6 fare bir kafeste gruplandırılarak oluşturulmuştur. Dişiler her gün sabahın erken saatlerinde vajinal tıkaç varlığı açısından kontrol edilmiştir. Vajinal tıkaçın tespit edildiği gün embriyonun 0,5. günü (E0,5) olarak kabul edilmiştir. Dişi farelerin tamamında vajinal tıkaçın varlığı doğrulandıktan sonra erkek fareler kafesten çıkarılmıştır. İzolasyon stresini önlemek için iki gebe fare aynı kafeste tutulmuştur. Gebeliğin 11. ve 12. günlerinde anne farelere ya IP Poly (I:C) (5 mg/kg) ya da PBS (17) verilmiştir. Kontrol yavru grubu oluşturmak için gebe farelerin bir kısmına PBS uygulanmıştır. Gebe fare grupları, stabil sıcaklık ve nem ile aynı odada tutulmuştur. Ağırlık, fizik muayene, aktivite, yem ve su tüketimi takibi sonrasında gruplar birbirinden farklı bulunmamıştır. Sütten kesildikten sonra (24-28 gün arasında), yavruların (n: 20) davranış testleri yapılmış ve MİA modelini doğrulamak için Poly (I:C)(n: 14) ve PBS (n: 6) yavru grupları birbiriyle karşılaştırılmıştır. Poly (I:C)(n: 14) ve PBS (n: 6) grupları, ip Poly (I:C) veya PBS uygulanan farklı annelerin yavrularından oluşmaktadır. Davranış deneylerinde bu yaşta cinsiyet ayrımının zor olması nedeniyle her iki cinsiyet de değerlendirilmiştir. Otizm spektrum bozukluğu belirtileri erken çocukluk döneminde görüldüğünden, çocukluk dönemini yansıması açısından bu zaman aralığı seçilmiştir. Şekil 1, deneylerimizin prosedür şemasını göstermektedir. Davranışsal test analizinin ardından Poly (I:C) grubundaki hayvanlar "Poly (I:C) Grubunda Davranış Testi Parametrelerine Göre Gruplandırma" bölümünde açıklanan davranışsal parametrelere göre gruplandırılmıştır. Poly (I:C) grup 1 stereotipik davranış dominant (StD) alt grubunu (n: 4) ve Poly (I:C) grup 2 ise sosyal deficit dominant (SDD) alt grubunu (n: 4) temsil etmektedir.



Şekil 1. Deney akış şeması (BGT: bilye gömme testi, MİA: maternal immün aktivasyon, PN: doğum sonrası, ÜÇST: üç çemberli sosyalizasyon testi, YOTT: yeni obje tanıma testi, YTSST: yabancı/ tanınmış sosyal tercih testi).

Davranış Deneyleri

OSB'de farklı semptomları (sosyal defisit, stereotipik davranış, bilişsel performans) değerlendirmek üzere davranış testleri seçilmiştir. Sosyal davranışları değerlendirmek için üç odalı sosyalleşme testi, stereotipik davranışları değerlendirmek için bilye gömme testi ve bilişsel performansı değerlendirmek için yeni obje tanıma testi uygulanmıştır. Deneyler gruplara kör bir gözlemci tarafından Ethovision XT8 kullanılarak analiz edilmiştir.

Üç Çemberli Sosyalizasyon Testi (ÜÇST)

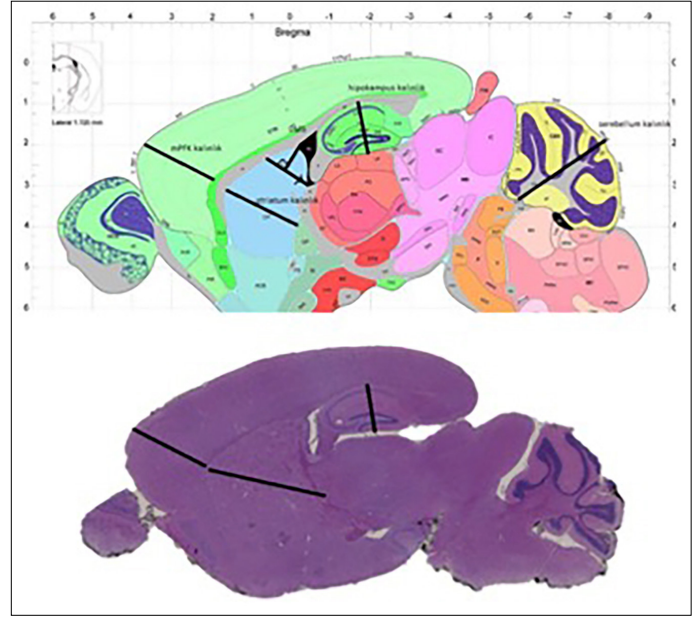
Erkek ve dişi fareler, alıştırma için bir saat boyunca temiz bir taşıma kafesine yerleştirilmiştir. Ardından toplam 10 dakika boyunca üç bölmeli boş alana bırakılıp serbestçe keşfetmelerine izin verilmiştir. Ertesi gün, bir bölmeye kafes içinde plastik bir oyuncak fare, diğer bölmeye ise başka bir canlı fare kafes içinde yerleştirilmiştir. Daha sonra fareler, diğer bölmelerin kapıları kapalı olacak şekilde beş dakika boyunca orta bölmeye yerleştirilmiş, beş dakika sonra kapılar açılıp farelerin tüm bölmeleri serbestçe keşfetmesine izin verilmiştir. Her oturumda, canlı farelerin ve oyuncak farenin bulunduğu bölmelerde geçirilen toplam süre kaydedilmiş ve sosyal endeks skorları (canlı farelerin bulunduğu bölmede geçirilen süre / canlı farelerin bulunduğu bölmede geçirilen süre + oyuncak farenin bulunduğu bölmede geçirilen süre) her hayvan için hesaplanmıştır. Her bölmeye giriş sıklığı ve her bölmeye ilk giriş gecikmesi kaydedilmiş, sıklık endeksi süre endeksi gibi hesaplanmıştır. Gecikme saniye olarak kaydedilmiştir (18).

Yabancı/Tanıdık Sosyal Tercih Testi (YTSTT)

Bu test, sosyal bellekteki bozuklukları belirlemek amacıyla üç çemberli sosyalizasyon testi sonrasında yapılmıştır. Üç çemberli sosyalizasyon testinin ertesi günü, daha önce plastik fare oyuncaklarının bulunduğu bölmeye yabancı bir fare yerleştirilmiştir. Karşı odaya tanıdık bir fare yerleştirilmiştir. Daha sonra test edilecek fare orta bölmeye yerleştirilmiş ve kapılar 10 dakika boyunca ortamın incelenmesine olanak sağlayacak şekilde açık bırakılmıştır. Normal koşullar altında fareler, tanıdık olmayan farelerle daha fazla zaman geçirmektedir. Her oturumda, canlı farelerin ve oyuncak farenin bulunduğu bölmelerde geçirilen toplam süre kaydedilmiş ve sosyal endeks puanları (tanıdık olmayan farelerin bulunduğu bölmede geçirilen süre / tanıdık olmayan farelerin bulunduğu bölmede geçirilen süre + tanıdık farelerin bulunduğu bölmede geçirilen süre) her hayvan için hesaplanmıştır. Her odaya giriş sıklığı ve her odaya ilk giriş gecikmesi kaydedilmiştir. Sıklık endeksi süre endeksi gibi hesaplanmış, gecikme saniye olarak kaydedilmiştir (19).

Yeni Objeye Tanıma Testi (YOTT)

Bu test farelerin kısa ve uzun süreli obje belleğini değerlendirmek için kullanılmaktadır (20). Deneylerimizde de OSB grubunda farklılık gösteren öğrenme ve zihinsel esnekliği değerlendirmek için seçilmiştir. Fareler 22,5×22,5×30 cm ölçülerindeki kutuya yerleştirildikten sonra, kutuya alışmaları için 10 dakika beklenmiştir. Ertesi gün kutunun köşelerine 6 cm aralıkla iki obje yerleştirilmiş ve fareler 10 dakika süreyle kutunun içinde tutulmuştur. Bu kutuda her bir obje ile geçirdikleri süre ve objelerin bulunduğu alanlara giriş sıklıkları kaydedilmiştir. Kısa süreli belleğin değerlendirilmesi amacıyla altı saat sonra objelerden biri yeni bir objeyle değiştirilmiş ve beş dakika boyunca her objenin etrafında geçirilen süre ve objelerin bulunduğu bölgelere giriş sıklığı kaydedilmiştir. Belleği iyi olan farelerin eski objeleri öğrenmesi ve hatırlaması beklendiğinden, yeni objenin etrafında daha fazla zaman geçirmeleri ve/veya yeni obje alanına daha fazla girmeleri beklenmektedir. Yeni obje tanıma testi endeksi, yeni objenin etrafında harcanan zaman veya sıklığın "yeni+eski" etrafında harcanan zaman veya sıklığın toplamına bölünmesiyle hesaplanmıştır.



Şekil 2. Allen Brain Atlas koordinatlarına göre medial prefrontal korteks, hipokampus ve striatumda bölgesel kalınlık ölçümü.

Bilye Gömme Testi (BGT)

Gömülü bilye sayısı ile tekrarlayıcı davranış arasında bir ilişki vardır (17). Fareler 30-60 dakika boyunca 3-4 cm talaş içeren temiz bir kafese alıştırdıktan sonra, kafes içerisine ızgara şeklinde simetrik olarak 20 adet bilye yerleştirilmiştir. On beş dakikalık inceleme fırsatının ardından fareler kafeslerine geri konmuş ve gömülü bilyeler sayılmıştır. Tamamen gömülü ve 3/4'ünden fazlası gömülü bilyeler dikkate alınmıştır.

Morfolojik Analiz

Davranış testlerinin tamamlanmasından sonra hayvanlara, %4 PFA ile anestezi altında kardiyak perfüzyon yapılmıştır. Beyinler formaldehitte sabitlenmiş ve parafine gömülmüştür. Mikrotomla dört mikrometrelik sagittal kesitler alınmıştır. Deparafinizasyondan sonra kesitler azalan alkol serileri ile rehidrate edilmiştir. Hematoksin ve eozin (H&E) boyaması yapılmıştır (21). Yüz mikrometre aralıklarla alınan üç kesitte bölgesel kalınlıklar ölçülmüş ve her hayvan için ortalaması alınmıştır (n=4 fare/grup, toplam 12 fare). Poly (I:C) alt grupları, "Poly I:C Grubunda Davranış Testi Parametrelerine Göre Gruplandırma" bölümünde açıklandığı gibi davranışsal test parametrelerine göre belirlenmiştir. Buna göre Poly (I:C) grup 1 (StD) için dört fare, Poly (I:C) grup 2 (SDD) için dört fare ve PBS kontrol grubu için dört fare seçilmiştir.

Bölgesel Kalınlık Ölçümü

Slideviewer programıyla her sagittal beyin kesitinden alınan H&E boyalı görüntülerden kalınlık ölçülmüştür. Medial prefrontal korteks, hipokampus ve striatum üzerinde çalışılmış ve her beyin bölgesinin koordinatları için Allen Beyin Atlas'ına (<https://developingmouse.brain-map.org/static/atlas>) başvurulmuştur (Şekil 2).

İstatistik

İstatistiksel analiz için IBM Sosyal Bilimlerde İstatistik Paket Programı sürüm 25 kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Analizlerde normal dağılım göstermeyen veriler için iki veri grubunun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla bağımsız grup karşılaştırıldığında ise normal dağılım göstermeyen veri grupları için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Tüm testlerde 0,05'in altındaki p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Davranış Testi Sonuçları

Üç Çemberli Sosyalizasyon Testi (ÜÇST)

Poly (I:C) grubunda sosyal bölme için hesaplanan sosyalizasyon endeksi kontrollere göre anlamlı düzeyde farklı bulunmamıştır ($p=0,216$). Sosyal hedef bölmenin bir yarısına yerleştirildiğinden, farelerin sosyal hedefi içeren yarıda vakit geçirmeyi tercih edip etmediği test edilmiştir. Önceki gözleme paralel olarak sosyal bölmede farelerin bulunduğu yarı için (sosyal yarıbölme) sosyal tercih endeksi Poly (I:C) grubunda kontrollere benzer bulunmuştur ($p=0,804$). Mann-Whitney U testi ile iki grubun sosyal bölmeye ve sosyal yarıbölmeye giriş sıklığı endeksi analiz edildiğinde sonuç farklı bulunmamıştır ($p=0,934$). Poly (I:C) grubunda sosyal bölmeye ve sosyal yarıbölmeye ilk giriş gecikmesi daha uzun bulunmuştur ancak Poly (I:C) ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,364$) (Tablo 1).

Yabancı/Tanıdık Sosyal Tercih Testi (YTSTT)

Tanıdık bir fare yerine yabancı bir fareyle etkileşime girme tercih endeksi Poly (I:C) ve PBS grupları arasında benzer bulunmuştur ($p=0,804$). Yabancı farenin bulunduğu bölme ilk girme gecikmesi ve yabancı farenin bulunduğu bölme giriş sıklığı endeksi gruplar arasında farklı bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,160$; $p=0,620$) (Tablo 1).

Lokomotor Aktivite ve Yeni Objeye Tanıma Testi (YOTT) Sonuçları

Lokomotor aktivite her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,216$). Fosfat tamponlu salin ve Poly (I:C) grupları için yeni objeyi keşfetmek için harcanan sürenin her iki objeyi keşfetmek için harcanan toplam süreye oranı sırasıyla %48 ve %47 bulunmuştur. Yeni objeye tanıma endeksinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,869$). Yeni objeye alanına girişin sıklık endeksi ve yeni objeye alanına ilk giriş gecikmesi PBS ve Poly (I:C) grupları arasında benzer bulunmuştur (sırasıyla $p=0,869$; $p=0,41$) (Tablo 1).

Bilye Gömme Testi (BGT)

Tamamen gömülü ve 3/4 gömülü bilye sayıları Poly (I:C) ve PBS grupları arasında farklı bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,611$; $p=0,424$) (Tablo 1).

Poly (I:C) Grubunda Davranış Testi Parametrelerine Göre Gruplandırma

Önceki çalışmaların aksine, doğum öncesi Poly (I:C) maruziyetinin doğum sonrası dördüncü haftada OSB benzeri davranışlar üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkileri bulunmamıştır. Bununla birlikte, sosyal tercih endeksindeki değişkenliğin yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, Poly (I:C)'ye tabi tutulan farelerin yalnızca bir alt grubunun OSB benzeri davranış geliştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç, OSB'nin çok faktörlü etiyolojik hipoteziyle uyumludur. Doğum öncesi viral enfeksiyonlara maruz kalma OSB için bir risk faktörü olmasına rağmen, doğum öncesi viral enfeksiyona maruz kalan çocukların hepsi OSB belirtileri göstermez. OSB'nin gelişmesinde hem genetik hem de çevresel faktörlerin katkısı gereklidir.

Bu nedenle olası alt gruplar için davranışsal verileri daha ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Poly (I:C) grubunda ilgi çekici bir şekilde iki grup ayırt edilebilmektedir: Birinci Poly (I:C) grubu (StD) çoğunlukla stereotipik davranışlar gösterirken, ikinci Poly (I:C) grubu (SDD) ise esas olarak sosyalleşme defisiti göstermektedir (Şekil 3a ve 3b).

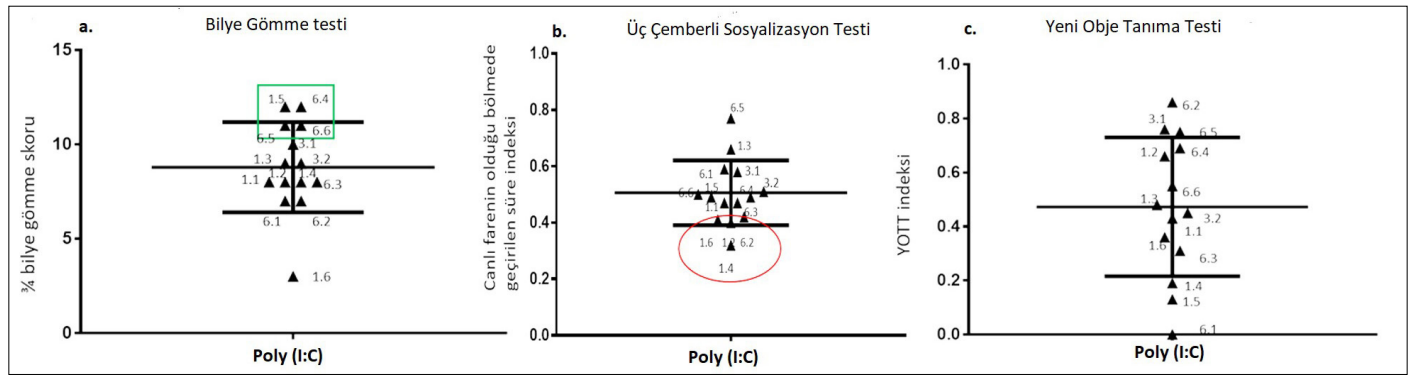
Sosyal defisit dominant olduğu (SDD) grup stereotipik davranış için değişkenlik göstermiştir, yani bu gruptaki fareler yüksek veya düşük stereotipik davranışa sahiptir. Benzer şekilde, stereotipik davranış dominant (StD) grubunun sosyal davranışları da yüksek değişkenlik göstermiştir, yani bu gruptakilerde yüksek ve düşük sosyalizasyon endeksinde sahiptir. Bilişsel performanstaki değişkenlik de hem SDD hem de StD gruplarında gözlemlenmiştir. (Şekil 3 ve Tablo 2).

Ayrıca seçilen gruplardaki (StD, SDD) sosyalizasyon bozukluğunun ve stereotipik davranışların PBS uygulanmış annelerin yavrularından farklı

Tablo 1. Fosfat tamponlu salin and Poly (I:C) gruplarında davranış test sonuçlarının karşılaştırılması

Test	PBS n=6 ort ± sd	Poly (I:C) n=14 ort ± sd	İstatistik (Mann-Whitney U-testi)
ÜÇST- Sosyal bölmedeki süre endeksi	0,60±0,12	0,50±0,08	$p=0,216$, $z=-1,237$
ÜÇST- Sosyal bölmeye giriş için frekans endeksi	0,5±0,24	0,46±0,19	$p=0,934$, $z=0,082$
ÜÇST- Sosyal bölmeye ilk giriş gecikmesi (dk)	0,96±0,46	2,04±1,18	$p=0,364$, $z=-0,907$
ÜÇST- Sosyal yarıbölmedeki süre endeksi	0,61±0,12	0,52±0,10	$p=0,284$, $z=-1,072$
ÜÇST- Sosyal yarıbölmeye giriş için frekans endeksi	0,56±0,12	0,52±0,20	$p=0,805$, $z=-0,247$
ÜÇST- Sosyal yarıbölmeye giriş gecikmesi (dk)	0,96±0,46	2,04±1,86	$p=0,364$, $z=-0,907$
YTSTT- Yeni sosyal hedef bölgesindeki süre endeksi	0,52±0,06	0,47±0,02	$p=0,804$, $z=-0,248$
YTSTT- Yeni sosyal hedef bölgesine giriş için frekans endeksi	0,55±0,09	0,60±0,05	$p=0,620$, $z=-0,495$
YTSTT- Yeni sosyal hedef bölgesine ilk girişte gecikme (dk)	3,00±0,30	1,7±0,48	$p=0,160$, $z=-1,404$
YOTT- Yeni objeye alanında geçirilen süre endeksi	0,48±0,04	0,47±0,06	$p=0,869$, $z=-0,165$
YOTT- Yeni objeye alanına girme frekans endeksi	0,45±0,06	0,42±0,05	$p=0,869$, $z=-0,165$
YOTT- Yeni objeye alanına giriş gecikmesi (sn)	36,6±14,9	38,6±8,0	$p=0,741$, $z=-0,330$
YOTT- Lokomotor testinde hareket edilen mesafe (cm)	1477,53±69,8	1304,61±117,2	$p=0,216$, $z=-1,237$
BGT- Toplam bilye gömme puanı	3,6±1,1	5,00±0,6	$p=0,611$, $z=-0,509$
BGT- 3/4 bilye gömme puanı	7,50±0,7	8,7±0,6	$p=0,424$, $z=-0,800$

BGT: bilye gömme testi; PBS: fosfat tamponlu salin; Poly (I:C): poliyinosinik; polycytidylic asit; ÜÇST: üç çemberli sosyalizasyon testi; YOTT: yeni objeye tanıma testi; YTSTT: yabancı/tanıdık sosyal tercih testi.

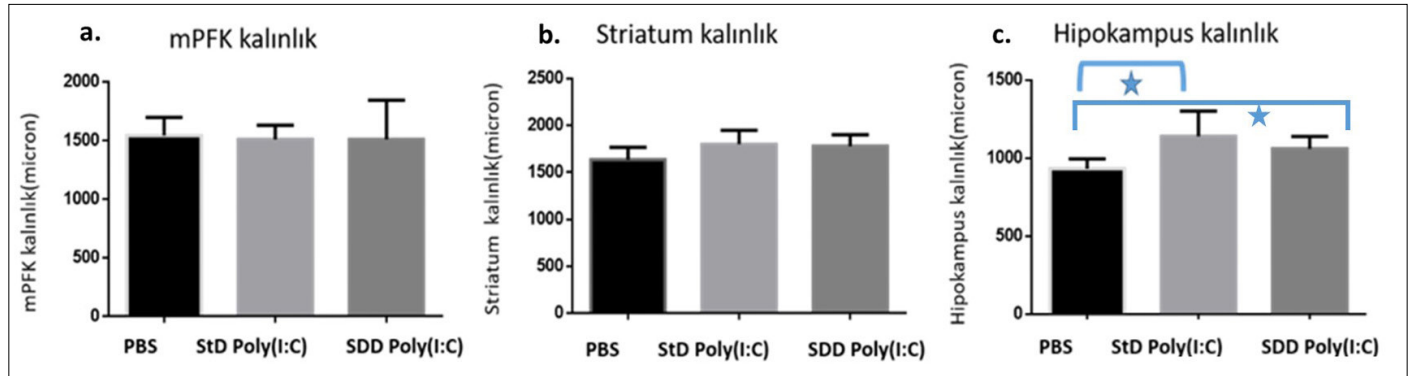


Şekil 3. Seçilen davranış testi sonuçlarının dağılımlarına göre Poly (I:C) grubundaki alt grupların belirlenmesi gösterilmektedir. **3a**, Poly (I:C) grubu içerisinde en yüksek 3/4 bilye gömme puanına sahip hayvanları içeren stereotipik davranışın baskın olduğu birinci Poly (I:C) grubunu göstermektedir. **3b**, Poly (I:C) grubu içinde sosyal bölmede en düşük süre endeksinde sahip hayvanları içeren sosyal defisiti dominant olan ikinci Poly (I:C) grubunu göstermektedir. **3c**, Poly (I:C) grubu içinde YOTT endeksinin dağılımındaki yüksek değişimi göstermektedir.

Tablo 2. Poly (I:C) alt gruplarının davranışsal özeti

Davranış test parametreleri	Poly (I:C) 1. grup StD (stereotipik davranış dominant)	Poly (I:C) 2. Grup SDD (sosyalizasyon defisiti dominant)
Sosyal bölmede geçirilen süre endeksi	yüksek/düşük	düşük
¾ bilye gömme skoru	yüksek	yüksek/düşük
YOTT süre endeksi	yüksek/düşük	yüksek/düşük

Poly (I:C): Poliinosinik-polisitidilik asit; YOTT: Yeni Obje Tanıma Testi.



Şekil 4. Üç gruptaki bölgesel kalınlığın analizi gösterilmektedir. **4a**'da medial prefrontal kortekste, **4b**'de striatumda gruplara göre bölgesel kalınlıkta istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmediği gösterilmiştir. **4c**'de hipokampus kalınlığının Mann Whitney U testiyle yapılan ikili gruplar arası karşılaştırmalarında, StD ve SDD Poly (I:C) grubunun kontrol PBS grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek hipokampus kalınlığına (p: 0,021) sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 3. Davranış alt gruplarına göre bölgesel kalınlık ölçümlerinin karşılaştırılması

Bölgesel kalınlık (mikron)	PBS n=4 ort ± sd	StD Grubu Poly (I:C) n=4 ort ± sd	SDD Grubu Poly (I:C) n=4 ort ± sd	İstatistik (Kruskal Wallis)
Mpfc kalınlığı	1543,64±154,75	1511,54±118,64	1510,48±335,19	p=0,926
Striatum kalınlığı	1636,88±133,46	1800,67±148,48	1780,34±121,13	p=0,227
Hipokampus kalınlığı	932,40±62,67	1138,77±162,44	1059,93±77,99	p=0,021

mPFK: Medial prefrontal korteks; PBS: Fosfat tamponlu salin; Poly (I:C): Polyinosinik: polycytdylic asit; SDD: sosyalizasyon defisit dominant; StD: stereotipik davranış dominant; YOTT: Yeni Obje Tanıma Testi.

olduğu Kruskal Wallis analizi ile doğrulanmıştır. Üç grup arasında total bilye gömme skoru (p=0,034), 3/4 bilye gömme skoru (p=0,022), sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi (p=0,018), sosyal bölmeye giriş frekans indeksi (p=0,021), sosyal yarı bölmede geçirilen zaman indeksi (p=0,012) ve sosyal yarı bölmeye giriş frekans indeksi (p=0,018) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

Hem yabanıl tip hem de Thy-YFP-1 farelerin kullanımıyla transgenisite etkilerini kontrol etmek için, üç Thy-YFP-1 transgenik fare ve üç yabanıl

tip fareyi içeren kontrol grubunun davranış verileri ayrıca analiz edilmiştir. Gruplar arasında OSB benzeri davranışlar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bölgesel Kalınlık Ölçümü Sonuçları

Davranışlardaki bu farklılıkların beyin morfolojisine yansıyor yansımadığını test etmek için OSB'nin patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiş beyin bölgelerinin bölgesel kalınlığı ölçülmüştür. Seçilen deneklerden (n=4/ grup) hipokampus, striatum ve medial prefrontal korteks olmak üzere üç

beyin bölgesindeki kalınlık ölçümleri Kruskal Wallis ile karşılaştırılmıştır. Üç grup arasında ortalama mPFC kalınlığı ve striatum kalınlığı gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Ancak ortalama hipokampus kalınlığı üç grup arasında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p=0,021$). Ayrıca hipokampus kalınlığının Mann Whitney U testiyle yapılan ikili gruplar arası karşılaştırmalarında, PBS-StD Poly(I:C) grubu arasında ($p=0,021$) ve PBS-SDD Poly(I:C) grupları arasında ($p=0,021$) istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmiştir (Şekil 4 ve Tablo 3).

Bölgesel Kalınlık ve Davranışsal Test Sonuçlarının Korelasyonu

Araştırılan tüm beyin bölgelerindeki farklı mediolateral koordinatlardan alınan ortalama bölgesel kalınlıklar, korelasyon açısından tekrar analiz edilmiştir. Hipokampal kalınlık total bilye gömme skorları ile pozitif korelasyon göstermiştir ($p=0,040, r=0,554$). Yeni obje tanıma testi süre endeksi striatum kalınlığı ile pozitif korelasyon göstermiştir ($p=0,029, r=0,582$). Hipokampus kalınlığı striatum kalınlığı ile güçlü bir korelasyon göstermiştir ($p=0,003, r=0,723$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada midgestasyonal Poly (I:C) kaynaklı MİA modelinin postnatal 24-28. günlerde sosyalleşme davranışında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığını gösterilmiştir. Öte yandan, gerçek yaşamı taklit eder şekilde davranış testi sonuçlarında yüksek değişkenlik olduğu görülmüştür ve davranış test parametrelerine bağlı olarak hayvanlar gruplandırılmıştır. Üç çemberli sosyalizasyon testinde sosyal bölmeye ait süre endeksi ve bilye gömme skorları alt grupları belirlemede faydalı bulunmuştur. Poly (I:C)'ye doğum öncesi maruz kalan farelerin yalnızca bir alt grubunun OSB benzeri davranış geliştirmesi bunun için olası bir açıklamadır, çünkü benzer alt gruplar klinikte de OSB hastalarında görülebilir. Stereotipik davranış dominant Poly (I:C) grubu özellikleri, belirgin stereotipik davranışlara sahip ancak normal/yüksek IQ seviyelerine sahip ve yüksek işlevli ASD olarak sınıflandırılan hafif sosyalizasyon defisitleri olan OSB hastalarına benzemektedir. İkinci Poly (I:C) grubu, ciddi sosyalizasyon defisiti ve değişken stereotipik davranışlar gösteren, düşük/normal IQ puanlarına sahip düşük işlevli OSB olarak kategorize edilen OSB hastalarına benzerlik göstermiştir (22).

Çalışmamızın daha önceki çalışmalara göre avantajlarından biri, ergenlik öncesi farelerde, yani OSB'nin ilk teşhis edildiği yaşlara karşılık gelen davranışsal ve morfometrik değişikliklerin araştırılmasıdır. Maternal immün aktivasyon fare modellerinde, yetişkin yavrularda OSB ile tutarlı gen ekspresyonu, nöroanatomi ve nörokimiyadaki değişiklikler ilişkilendirilmiş olsa da (14,15), yetişkinlik döneminde yürütülen çalışmalar adaptif değişiklikleri göz ardı edemez. Ayrıca yaşın, C57BL/6 dâhil bazı genetik altyapılarda nöropsikiyatrik bozukluk modellerinde farklılıklar yarattığı gösterildiğinden, yetişkin farelerde fetal beyin gelişimine dair bulgular tam olarak yakalanamayabilir (13,23).

Maternal immün aktivasyon modellerinde Poly (I:C) kullanımının zamanlaması ve dozu da davranış ve immünolojik yanıt üzerinde etkisi olduğu tespit edilen faktörlerdendir (11). Bu alandaki diğer araştırmacıların da endişeleri üzerine, ön denemelerimizde de gözlenen düşük, yavru sayısının azlığı ve toksisite riskini bu deneylerde göze alamadığımız için gebelikte iki kez ip 5 mg/kg dozu uygulanmıştır (24). Daha önceden yüksek dozajın davranışsal farklılıklarla ilişkili bulunduğu gösterilmiştir (14,15), ancak bu çalışmalarda genellikle sıçanlar ve yetişkin hayvanlar kullanılmıştır. Bu da çalışmamızda PBS ve Poly (I:C) grubu arasında davranış açıdan farklılık bulamamanın bir diğer olası açıklaması olabilir. Ayrıca çalışmamızdaki gebe fareler C57 arıyetişimi taşımalarına, aynı kaynaktan, aynı yaş ve kiloda alınmalarına rağmen, çalışmada kullanılan yavrular gibi, aynı anneden doğan yavrular değildir. Dolayısıyla fare kökenindeki genetik değişkenliğin de sonuçlarımız üzerinde hafif bir etkisi olmuş olabilir.

Çevresel faktörlerin beyindeki etkisinin alana özgü olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, MİA da çevresel faktörleri modellediğinden, belirli beyin alanlarındaki değişikliklerin dikkate alınması gerekir. Örneğin; OSB'li insan ikiz nörogörüntüleme çalışmasında, orbitofrontal korteks (OFK) ve anterior singulat korteksteki gri madde kalınlığının OSB ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca stereotipik davranışların şiddeti de OFK kalınlığı ile korele bulunmuştur (25). mPFC, hipokampus, striatum OSB araştırmalarında en çok çalışılan alanlardır ve bunların sosyal davranış farklılıkları, sınırlı ilgi alanı, stereotipik davranışlar ve duyu bütünleme sorunlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (26,27). Erken çocukluk döneminde semptomların başlangıcında baş çevresi, beyin hacmi ve korteksteki nöron sayısının arttığı insan OSB çalışmalarında gösterilse de (1,2), morfolojik veya işlevsellik farkı gösteren belirli beyin alanlarındaki değişikliklerin bozukluğun sonuçları ni nedenleri mi olduğu açık değildir. Olası bir açıklama olarak, doğum öncesi immün aktivasyonun, özellikle nörogelişimdeki kritik hassas dönemlerde patogeneze rol oynadığı varsayılmaktadır. Bu ilişkiyi doğrulamak için MİA hayvan modeli çalışma bulguları, annenin immün aktivasyonu ile bölgesel gelişim arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (14).

Otizm spektrum bozukluğu alt gruplarımızın morfometrik farklılıklarını ve korelasyonlarını kontrol ettiğimizde, Poly (I:C) StD alt grubunda hipokampusun görece daha kalın olduğu ve stereotipik davranışın hipokampus kalınlığı ile pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür. Otizm spektrum bozukluğu deneklerinde bildirilen beyin hacmi değişiklikleri, sinaptik budamadaki eksikliklerle ilişkilendirilmiştir. Mikroglial sinaptik budanmada önemli rol oynarlar ve hipokampusta doğum sonrası 14-28. günler arasında mikroglial aktivasyonda önemli değişiklikler gösterilmiştir (28). Mikroglial aktivasyonun bu kritik zamanlaması, çalışmamızda StD alt grubunda alana özgü (hipokampus) kalınlık artışının nedeni olabilir. Ayrıca Poly (I:C) gruplarını ikili karşılaştırdığımızda SDD grubunda PBS grubuna göre hipokampus kalınlığı yine anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Budanma eksiklikleri, çalışmamızda bulunan yüksek hipokampus kalınlığının ve sosyal davranış eksikliğinin (sosyal yanıt bölmedeki süre endeksi) açıklamalarından biri olabilir. Hayvan modellerinde hipokampustaki lezyonlar, CA1, CA2'nin inaktivasyonu ve protein sentezi inhibisyonunun birçok kez sosyal tanıma bozukluklarına sebep olduğu gösterilmiştir (29). Bu bulgular, hipokampusun, sosyal davranışın önemli bileşenleri olan sosyal bellek ve tanıma için çok önemli olduğunu göstermektedir (9). Bununla birlikte, araştırmamızda alana özgü değişikliklerin sinaptik budanma ve bölgesel kalınlık değişiklikleriyle ilişkisini destekler şekilde hücresel seviyedeki belirli farklılıklarla eşleşip eşleşmediği, ek bir immünohistolojik veya moleküler yöntemle gösterilememiştir.

Gruplarımız arasında striatum kalınlığı açısından fark bulunmamıştır. Striatum genel olarak stereotipik davranışlarla ilişkili olduğu tespit edilen beyin bölgesi olmasına rağmen çalışmamızda striatum kalınlığı ile YOTT endeksi arasında bir korelasyon bulunmuştur. Bu durum striatumun hafızayı düzenleyici etkisi ile ilişkili olabilir (30). Hipokampus ve striatum kalınlığı güçlü bir pozitif korelasyon göstermiştir. Bu da, öğrenme ve stereotipik davranış bağlamında, sosyal davranış düzenlemek için karşılıklı konuşan bu alanlar arasındaki ilişkilerin sonucu olabilir. Aynı zamanda bilye gömme skorunun hipokampus kalınlığıyla pozitif korelasyon göstermesinin de olası bir açıklaması olabilir. Ayrıca, daha yüksek YOTT süre endeksine eşlik eden daha yüksek striatal kalınlık, yüksek fonksiyonel otizm grubunda görülen daha iyi IQ puanlarının bir görünümü olarak düşünülebilir. Bu, ilk Poly (I:C) grubundaki (StD) daha iyi sosyalleşme puanlarının ardındaki kompanzatuvar mekanizmanın sonucu da olabilir; çünkü sosyal davranışlar temel olarak öğrenme olmadan değerlendirilemez.

Şaşırtıcı bir şekilde mPFC kalınlığı ile otistik benzeri davranışlar arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu, farelerin ömründe yürümeye başlayan çocuk aşamasına karşılık gelen deneylerimizin zamanlaması (PN24-28.

gün) ile ilgili olabilir. Deneylerimizi prefrontal korteks olgunlaşmasından önce olabilecek bu yaş aralığında yapmamız, medial prefrontal korteks kalınlığında farklılık bulamamamız nedenlerinden biri olabilir. Prefrontal korteks beyin gelişim sıralamasına göre düzenlenecek en son bölgedir. Ayrıca araştırmamızda örneklem büyüklüğünün küçük olması ve denekler arasındaki değişkenlik, sonuçlarımızın yorumlanmasını sınırlamış olabilir.

Maternal immün aktivasyonun OSB'de klinik heterojenliği modellemek için kullanılabileceğini öneriyoruz. Maternal immün aktivasyona doğum öncesi maruz kalma, bir fare alt grubunda stereotipik davranışların artmasına ve başka bir alt grupta sosyal defisitinin artmasına neden olmuştur. Alt gruplar, klinik fenotiplere benzer şekilde bilişsel performans puanlarında farklılıklar göstermiştir. StD grubumuzun diğer alt gruplara göre daha kalın hipokampusu sahip olduğu görülmüştür. Hipokampal kalınlıktaki farklılığın stereotipik davranışla ilişkili olduğu, striatal kalınlığın ise öğrenme ve bellek ile ilişkili olduğu bulunmuştur. OSB'deki semptom grupları ve fenotiplerin altında yatan mekanizmaların, zamanlama ve beyin bölgelerine bağlı olarak birbirinden farklı olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak alt gruplar arasındaki bu farklılıkların ardındaki moleküler aktörler incelenmemiştir. Daha büyük örneklerde yapılacak gelecekteki OSB MİA çalışmaları, semptom heterojenliğini dikkate alarak moleküler mekanizmaları ele almalıdır.

Teşekkür: Parafinli beyin kesitleri Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda H-E yöntemiyle elde edildi ve boyandı. Bu çalışmadaki mikroskopik değerlendirme de Ankara Üniversitesi Bilim Fonu (BAP) projesi ile elde edilen dijital patoloji sistemi (14A0230003) ile yapılmıştır.

Mikroskopik değerlendirmedeki değerli mentorluğu ve rehberliği için Prof. Aylin Heper Okçu'ya minnettarız. Kesitlerin alınmasında Kadriye Yücel Aydın'a, boyama işlemlerinde ise Filiz Yeşilyurt'a ve dijital görüntüleme sürecinde Gökhan Özdoğan'a gösterdiği titizlik ve emeklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı: Hayvan kullanımına ilişkin tüm prosedürler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/07-02) ve prosedürlerde Ulusal Araştırma Konseyi'nin Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu (8. baskı) (16) takip edilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- DÜ, EEK; Tasarım- DÜ, EEK; Denetleme- DÜ, EEK, ABY; Kaynaklar- DÜ, EEK, ABY; Malzemeler- DÜ, ABY; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- DÜ, EEK, ABY, TBK; Analiz ve/veya Yorum- DÜ, EEK, ABY; Literatür Taraması- DÜ, EEK, AV; Yazıyı Yazan- DÜ, EEK, ABY, TBK; Eleştirel İnceleme- DÜ, EEK.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Çalışmalar Proje Birimi (Proje ID:18547).

KAYNAKLAR

- Schumann CM, Nordahl CW. Bridging the gap between MRI and postmortem research in autism. *Brain Res.* 2011;1380:175–186. [Crossref]
- Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011;306(18):2001–2010. [Crossref]
- Wegiel J, Flory M, Kuchna I, Nowicki K, Ma SY, Imaki H, et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):1–18. [Crossref]
- Nickl-Jockschat T, Habel U, Maria Michel T, Manning J, Laird AR, Fox PT, et al. Brain structure anomalies in autism spectrum disorder—a meta-analysis of VBM studies using anatomic likelihood estimation. *Hum Brain Mapp.* 2012;33(6):1470–1489. [Crossref]
- Patriquin MA, DeRamus T, Libero LE, Laird A, Kana RK. Neuroanatomical and neurofunctional markers of social cognition in autism spectrum disorder. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(11):3957–3978. [Crossref]
- Fenlon LR, Liu S, Gobius I, Kurniawan ND, Murphy S, Moldrich RX, et al. Formation of functional areas in the cerebral cortex is disrupted in a mouse

- model of autism spectrum disorder. *Neural Dev.* 2015;10(1):1–14. [Crossref]
- Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genet.* 2014;46(8):881–885. [Crossref]
- Hornig M, Bresnahan MA, Che X, Schultz AF, Ukaigwe JE, Eddy ML, et al. Prenatal fever and autism risk. *Mol Psychiatry.* 2018;23(3):759–766. [Crossref]
- Gzielo K, Piotrowska D, Litwa E, Popik P, Nikiforuk A. Maternal immune activation affects socio-communicative behavior in adult rats. *Sci Rep.* 2023;13(1):1918. [Crossref]
- Haida O, Al Sagheer T, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Soria F, et al. Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl Psychiatry.* 2019;9(1):124. [Crossref]
- Haddad FL, Patel SV, Schmid S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical model for neurodevelopmental disorders: a focus on autism and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;113:546–567. [Crossref]
- Amodeo DA, Lai CY, Hassan O, Mukamel EA, Behrens MM, Powell SB. Maternal immune activation impairs cognitive flexibility and alters transcription in frontal cortex. *Neurobiol Dis.* 2019;125:211–218. [Crossref]
- Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol.* 2019;175:1–19. [Crossref]
- Cieslik M, Gassowska-Dobrowolska M, Jesko H, Czapski GA, Wilkaniec A, Zawadzka A, et al. Maternal immune activation induces neuroinflammation and cortical synaptic deficits in the adolescent rat offspring. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4097. [Crossref]
- Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):537–566. [Crossref]
- Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
- Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science.* 2016;351(6276):933–939. [Crossref]
- Yang M, Zhodzishsky V, Crawley JN. Social deficits in BTBR T+tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25(8):515–521. [Crossref]
- Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nat Protoc.* 2020;15(10):3464–77. [Crossref]
- Zou D, Chen L, Deng D, Jiang D, Dong F, McSweeney C, et al. DREADD in parvalbumin interneurons of the dentate gyrus modulates anxiety, social interaction and memory extinction. *Curr Mol Med.* 2016;16(1):91–102. [Crossref]
- Onalapo AY, Onalapo OJ, Nwoha PU. Alterations in behaviour, cerebral cortical morphology and cerebral oxidative stress markers following aspartame ingestion. *J Chem Neuroanat.* 2016;78:42–56. [Crossref]
- Chakrabarti B. Commentary: Critical considerations for studying low-functioning autism. *J Child Psychol Psychiatr.* 2017;58(4):436–438. [Crossref]
- Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Sci Rep.* 2020;10(1):11263. [Crossref]
- Atanasova E, Arevalo AP, Graf I, Zhang R, Bockmann J, Lutz AK, et al. Immune activation during pregnancy exacerbates ASD-related alterations in Shank3-deficient mice. *Mol Autism.* 2023;14(1):1. [Crossref]
- Hegarty JP, 2nd, Pegoraro LFL, Lazzeroni LC, Raman MM, Hallmayer JF, Monterrey JC, et al. Genetic and environmental influences on structural brain measures in twins with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 2020;25(10):2556–2566. [Crossref]
- Banker SM, Gu X, Schiller D, Foss-Feig JH. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends Neurosci.* 2021;44(10):793–807. [Crossref]
- Li X, Zhang K, He X, Zhou J, Jin C, Shen L, et al. Structural, functional, and molecular imaging of autism spectrum disorder. *Neurosci Bull.* 2021;37(7):1051–1071. [Crossref]
- Delpech JC, Wei L, Hao J, Yu X, Madore C, Butovsky O, et al. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2016;57:79–93. [Crossref]
- Wang X, Zhan Y. Regulation of social recognition memory in the hippocampal circuits. *Front Neural Circuits.* 2022;16:839931. [Crossref]
- Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell.* 2014;157(7):1535–1551. [Crossref]