



## DeneySEL Otizm Spektrum Bozukluğu Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Likopenin Beyin IL-6, IL-10, FGF-2 ve NGF Düzeyleri Üzerine Etkisi

Fusun ERTEN<sup>1,a</sup>, Hasan GENÇOĞLU<sup>2,b</sup>, Kazim ŞAHİN<sup>3,c,✉</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, Pertek Sakine Genç Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Tunceli, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 23119 Elazığ, TÜRKİYE

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-1657-7253; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-7716-552X; <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-9542-5244

Geliş Tarihi/Received  
12.11.2020

Kabul Tarihi/Accepted  
11.12.2020

Yayın Tarihi/Published  
31.12.2020

### Öz

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), batılı ve gelişmiş toplumlarda artan bir sorundur. Doğası gereği büyük ölçüde genetik olmasına rağmen, birçok çevresel faktör hassas popülasyonlarda OSB'yi tetiklemede rol oynayabilmektedir. Propiyonik asit (PPA) uygulaması, anormal nöral hücre organizasyonunu ve ardından otizm benzeri nörodavranışları içeren kritik değişiklikleri indükleyebilmektedir. Likopen ve metabolitleri beyinde kontrol edilebildiğinden, likopenin merkezi sinir sisteminde nöroprotektif etkileri olabileceği ve başlıca beyin biyo-belirteçleri üzerinde modülasyona neden olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, 35 adet üç haftalık yaşta Sprague Dawley ırkı erkek sıçan 5 gruba ayrıldı: i) Kontrol. ii) PPA; (500 mg/kg/ip). iii) PPA+LI (PPA'ya ek olarak, 5 mg/kg/gün intragastrik likopen verilen grup), iv) PPA+LII; (PPA'ya ek olarak, 10 mg/kg/gün intragastrik likopen verilen grup), v) PPA+LIII, (PPA'ya ek olarak, 20 mg/kg/gün intragastrik likopen verilen grup). Çalışma sonunda hayvanlar dekapite edildi ve beyin dokuları alınarak homojenize edildi ve SDS-PAGE ve western blot teknikleriyle beyinde enflamatuar sitokinler interlökin 6 ve 10 (IL6/IL10) ile temel fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve sinir büyüme faktörü (NGF) düzeylerinin değişimi tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre 35 günlük uygulama sonunda likopenin, PPA ile OSB modeli oluşturulan sıçanlarda, PPA'ya bağlı olarak artan IL-6 ve IL-10 düzeylerini özellikle PPA+LIII ve PPA+LII grubunda düşürdüğü tespit edildi. Bununla birlikte, FGF-2 ve NGF düzeyleri de her üç likopen grubunda da belirgin olarak PPA verilen gruba göre artış gösterdi (P<0,0001). Sonuç olarak, likopen, PPA ile indüklenen OSB benzeri nöropatolojik bozuklukları beyin inflammatuar sitokinleri ve büyüme faktörlerini regüle ederek azaltabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Likopen, otizm, propiyonik asit, sıçan modeli

### Effect of Lycopene on Brain IL-6, IL-10, FGF-2, and NGF Levels in Experimental Autism Spectrum Like Disorder induced Rats

#### Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a growing problem in western and developed civilizations. Although largely hereditary in nature, many environmental factors may play a role in triggering ASD in prone populations. Propionic acid (PPA) administration can induce serious changes including abnormal neural cell organization and subsequent autism-like neurobehavior. Since lycopene and its metabolites can be controlled in the brain, it is thought that lycopene may have neuroprotective effects on the central nervous system and may cause modulation on major brain biomarkers. In this study, 35 three-week-old Sprague Dawley male rats allocated to 5 groups: i) Control. ii) PPA; (500 mg/kg/ip). iii) PPA+LI (5 mg/kg/day intragastric lycopene given group in addition to PPA), iv) PPA+LII; (In addition to PPA, 10 mg/kg/day intragastric lycopene group), v) PPA + LIII, (20 mg/kg/day intragastric lycopene given group in addition to PPA). At the end of the study, animals were decapitated, and their brain tissues were removed and homogenized. The inflammatory cytokines interleukins 6 and 10 (IL6/IL10), basic fibroblast growth factor (FGF-2), and nerve growth factor (NGF) were obtained in the brain using SDS-PAGE and western blot techniques. Change of the expression levels was detected. According to the results, it was shown that after 35 days of administration, lycopene decreased the IL-6 and IL-10 levels due to PPA, especially in PPA + LIII and PPA + LII groups, in rats with ASD model by PPA. However, FGF-2 and NGF levels were significantly increased in all three lycopene groups compared to the PPA group (P<0.0001). In conclusion, lycopene may reduce PPA induced ASD-like neuropathological disorders by regulation of the brain inflammatory cytokines and the growth factors.

**Key Words:** Lycopene, autism, propionic acid, rat model

### GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal iletişim becerilerinde bozukluk, atipik duyuşsal yanıt ve tekrarlayan davranışlar şeklinde kendini gösteren ve beyin gelişimini etkileyen bir nörobilişsel bozukluktur (1). OSB, toplumda yaklaşık olarak

88 kişiden birini etkiler ve gelişim aşamasındaki beyni etkileyen heterojen bir nöropsikiyatrik bozukluk grubu olarak tanımlanan karmaşık bir hastalık tablosu olup, nedensel faktörleri tam olarak bilinmemekle birlikte, meydana gelmesinde daha ziyade kalıtsal etkenlerin rol oynadığına dair güçlü

kanıtlar vardır (2). Bununla birlikte hastalığın etiolojisinde ayrıca çevresel ve bağırsak mikrobiyotası ile ilgili faktörlerin de önemli olabileceği ve otizmin metabolik, bağışıklık ve gastrointestinal sistemleri etkileyen çoklu bir sistem bozukluğu olabileceği de düşünülmektedir (3).

Propionik asit (PPA) peynirde, süt ürünlerinde, rafine buğdayda bulunur ve koruyucu olarak da kullanılır (4). PPA, memeli bağırsağında kısa zincirli yağ asidi (SCFA) olarak iki işleme üretilir: Birincisi; enterik bakterilerin (*Clostridia* ve *Desulfovibrio* v.b.) metabolik bir son ürünü olarak ve ikincisi; birkaç diyetel ürünün bağırsakta fermantasyonu ile oluşması şeklindedir. PPA, beyine ulaşmak için bağırsak bariyerini ve kan-beyin bariyerini (bağırsak → kan → beyin) kolayca geçebilen zayıf bir organik asittir (1, 2). Organlarda artan PPA seviyeleri hücre içi asitleşmeye yol açmakta ve pro-inflamatuar sitokin konsantrasyonlarının artması yoluyla sistemik inflamasyonu tetikleyebilmektedir (3, 4).

Aşırı propiyonatin, kanda, serebro-spinal sıvı ve en önemli nöronal hücrelerde PPA seviyelerinin yükselmesi ile tanımlanan nörogelişimsel bir metabolik hastalık olan propiyonik asidemi gibi potansiyel olumsuz etkileri vardır (5, 6). Bu nedenle, PPA kan-beyin bariyerini geçer ve nörogelişimsel bozukluk etiolojisinde yer alan nörotransmitterlerin salınımını değiştirebilen ve geri dönüşümlü olan hücre içi asitlenme gibi çeşitli merkezi sinir sistemi (MSS) rahatsızlıklarına neden olur (7). Ayrıca, PPA, nörolojik bozulmaya neden olmasıyla, sinaptik aktarım ve diğer nöronal aktivite formlarını etkileyebilir. İn vitro çalışmalar, artan PPA seviyelerinin, reaktif oksijen ve azot türlerinin atılması ve enerji metabolizması ile ilgili çeşitli süreçleri etkilediğini göstermektedir (6). OSB 'nin klinik patolojisinin gelişiminde, diyetel metabolik ürünler ile genetik yatkınlık arasında önemli bir bağlantı görevi görmesi nedeniyle, PPA kaynaklı OSB modeli klinik bir öneme sahiptir (2,8, 9).

Likopen, güçlü bir antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-proliferatif aktiviteleri olan ve başlıca domates, karpuz ve papayadan ekstrakte edilebilen alifatik bir hidrokarbon karotenoiddir (10). Likopen, oksidatif hasar oluşturucu tekil oksijeni baskılayarak hücresel tahribata neden olan toksik reaktif oksijen türlerini etkinliğini azaltır ve antioksidan etkinlik göstermektedir (11). Likopen, karaciğer tümörleri, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve kalp yetmezliği gibi çeşitli hastalıkların iyileştirilmesinde potansiyel yararlı etkinliği olan bir bileşik olarak kabul edilmektedir (10, 11). Hasta bireylerde, likopen veya likopen içeren ürünlerin alınmasının, prostat kanseri ve tip II diyabet gibi hastalıklarda klinik semptomları hafiflettiği gösterilmiştir (11). Likopen ve metabolitleri beyinde kontrol edilebildiğinden, likopenin merkezi sinir sisteminde nöroprotektif etkileri olabileceğini tahmin etmek olasıdır. Bu hipotez, likopenin nörodejeneratif ve psikiyatrik bozukluklardaki rolünü araştıran önceki çalışmalarla desteklenmektedir (12, 13). Örneğin, likopen takviyesinin, P301-L mutasyonunu eksprese eden Tau transgenik farelerinde bilişsel performansı artırdığı ve kültür ortamındaki nöronlarda amiloid-β (Aβ) kaynaklı hücresel toksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (12). Ayrıca, likopen Huntington hastalığında (HD), süksinik asit dehidrojenazın geri dönüşümsüz bir inhibitörü olan 3-nitropropiyonik asit (3-NP) tarafından indüklenen bilişsel işlev bozukluğunu ve motor anormalliğini de inhibe edebilmektedir (13). 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) neden olduğu bir Parkinson hastalığı

modelinde, likopenin fare motor nöron anomalilerini tersine çevirdiği bulunmuş, ayrıca uzun süreli likopen alımının, serebral iskemi / reperfüzyondaki enfarktüs hacmini ve nöronal apoptozu ve erkeklerde inme riskini azalttığı gösterilmiştir (13, 14). Oksidatif stres ve mikroglial aktivasyonda, adenosin 5'-monofosfatla aktive olan protein kinazın (AMPK), peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör-γ (PPARγ) ve fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz (PI3K)/proteinin aktivasyonunun inhibisyonunda, protein kinaz B (Akt) sinyalinin, MSS bozukluklarında likopenin nöroprotektif etkilerine aracılık ettiği de tespit edilmiştir (13). Bu çalışmada, Sprague-Dawley ırkı sıçanlarda PPA kaynaklı otistik davranışa karşı likopenin üç farklı dozunun sıçan beyinde enflamatuar sitokinler interlökin 6 ve 10'un (IL6/IL10) yanısıra, temel fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve sinir büyüme faktörü (NGF) üzerine etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Deney Hayvanları

Çalışmada, Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (FÜDAM) satın alınan toplam otuz beş (35) adet üç haftalık yaşta Sprague Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Deneme, deney hayvanlarına yapılacak işlemler ile ilgili yönergeler doğrultusunda FÜDAM'da yürütüldü. Sıçanlar deneme süresince kontrollü sıcaklık ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), nem ( $55 \pm 10\%$ ), otomatik aydınlatma (12 saat aydınlık ve karanlık periyotlar) altında barındırıldı ve hayvanlara *ad libitum* olarak yem ve su verildi. Hayvanlar standart sıçan diyeti ile beslendi (Tablo 1). Deney prosedürleri, Fırat Üniversitesi yerel Hayvan Etik Komitesi, Elazığ, Türkiye (2019/51) tarafından onaylanmış olan izin ve laboratuvar hayvanlarının işlenmesine yönelik Ulusal Sağlık Enstitüleri Yönergesi kapsamında gerçekleştirildi.

Tablo 1. Standart diyet bileşimi

| Yem Hammaddeleri             | %     |
|------------------------------|-------|
| Mısır                        | 30.22 |
| Arpa                         | 10.07 |
| Soya Fasulyesi Küspesi       | 38.28 |
| Ayçiçeği Tohumu Küspesi      | 6.04  |
| Buğday Kepeği                | 10.08 |
| Melas                        | 3.02  |
| Kireç Taşı                   | 1.51  |
| Tuz                          | 0.08  |
| DL-Metiyonin                 | 0.30  |
| Dikalsiyum Fosfat            | 0.20  |
| Vitamin-Mineral Premiksi*    | 0.20  |
| Besin Madde Bileşimi         |       |
| Ham Protein %                | 24.00 |
| Metabolik Enerji (kcal/kg**) | 3100  |
| Ham Yağ %                    | 3.40  |
| Ham Selüloz %                | 6.90  |
| Kül %                        | 8.10  |
| Kalsiyum %                   | 1.30  |
| Fosfor %                     | 0.90  |

\*Vitamin-mineral karışımının kilogramı; 1.8 mg tüm-trans retinil asetat (A vitamini), 0.025 mg kolekalsiferol (D vitamini), 12.5 mg tüm rac-alfa-tokoferol asetat (E vitamini), 1.1 mg menadion sodyum bisulfid (K3 vitamini), 1.1 mg tiyamin (Vitamin B1), 4.4 mg ribolavin (Vitamin B2), 35 mg niyasin (Vitamin B3), 10 mg kalsiyum pantotenat (B5 vitamini), 2.2 mg Vitamin B6, 0.02 Vitamin B12, 0.55 mg folik asit, 0.1 mg d-biyotin, 40 mg Mn (MnO), 12.5 mg Fe (FeSO<sub>4</sub>), 25 mg Zn (ZnO), 3.5 mg Cu (CuSO<sub>4</sub>), 0.3 mg I (KI), 0.15 mg Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 175 mg kolin klorit (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>ClNO).

\*\*Metabolik enerji National Research Council (NRC)'e göre hesaplandı (29).

## Deneme Düzeni

Araştırma başlamadan önce hayvanlar bir hafta süreyle çalışma ortamına alıştırdı ve daha sonra rastgele olarak beş gruba ayrıldı (n=7): i) Kontrol: Sıçanlara standart pelet yem içeren bir diyet verildi ve diğer gruplar ile aynı strese sahip olmaları için 35 gün boyunca içme suyu gavajı ve çözücü madde enjeksiyonu uygulandı; ii) PPA (propiyonik asit): Sıçanlara 35 gün boyunca standart bir diyet ile beraber içme suyu gavajı uygulandı ve otizmi indüklemek için ilk 5 gün boyunca deri altından enjeksiyonla PPA (500 mg / kg / gün) verildi; iii) PPA + Likopen I: Sıçanlara 35 gün boyunca gavaj yoluyla likopen (5 mg / kg / gün; DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, İsviçre) verildi ve PPA, ilk 5 gün subkutan enjeksiyon yoluyla verildi; iv) PPA + Likopen II: Sıçanlara 35 gün boyunca gavaj yoluyla likopen (10 mg / kg / gün) verildi ve PPA ilk 5 gün subkutan enjeksiyon yoluyla verildi; 5) PPA + Likopen III: Sıçanlara 35 gün boyunca gavaj yoluyla likopen (20 mg / kg / gün) verildi, PPA ilk 5 gün subkutan enjeksiyon yoluyla verildi. Likopen dozları daha önceki çalışmalar esas alınarak belirlendi (15,16). Likopen içermeyen gruplara eşit hacimde (1 ml / sıçan) içme suyu oral gavaj ile uygulandı. Propiyonik asit (PPA, Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, ABD) çalışmanın başındaki ilk beş gün art arda ve her seferinde tek doz olmak üzere 0.1 M PBS içinde çözüldü ve 500 mg / kg (0.26 M, pH 7.4) dozunda deri altından uygulandı (17). Kontrol grubundaki sıçanlara aynı süre ve oranda fizyolojik serum çözeltisi enjekte edildi. Tüm gavaj işlemleri deney hayvanlarına özel tasarlanmış olan intragastrik besleme aparatı ile yapıldı. 35 günlük çalışma sonunda hayvanlar hafif eter anestezisi altında dekapite edilerek beyin dokusu örnekleri -80'de analiz edilmek üzere saklandı.

## Western Blot

Sıçanların beyin numuneleri bir cam-cam homojenizatör yardımıyla soğuk zincirde homojenize edildi ve sonrasında 1X proteaz ve fosfataz ile takviye edilmiş lizis tamponunda bir kokteyl inhibitörü kullanılarak sonikasyona tabi tutuldu. Her grup doku örneğine ait toplam protein içeriğini hesaplamak için bir nano spektrofotometre cihazı (MaestroGen, Las Vegas, NV) kullanıldı. Eşit miktarlarda protein (20 µg), SDS-PAGE işlemi ile akrilamid içeren jelle aktarıldı ve ardından Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad, Life Sciences Research) kullanılarak bir nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran daha sonra oda sıcaklığında 1 saat boyunca % 0.1 Tween (PBS; bloke edici çözelti) içeren fosfat tamponlu salin (PBS) içinde % 1 sığır serum albümininde bloke edildi, PBS içinde yıkandı ve ardından gece boyunca IL-6/10, FGF-2 ve NGF primer antikorları ile (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ABD) ile inkübe edildi. Membranlar ertesi gün PBS ile yıkandı ve ardından keçi anti-fare (Abcam, Cambridge, UK) sekonder antikorunu (1: 1000 seyreltilmiş) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren bir di-amino-benzantrazen (DAB) solüsyonla blotlama işlemi sonlandırıldı. Protein seviyeleri, bir görüntü analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak dansimetrik olarak analiz edildi, β-aktin blotları üzerinde belirlenen değerlerle doğrulandı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % nispi değerler olarak ifade edildi.

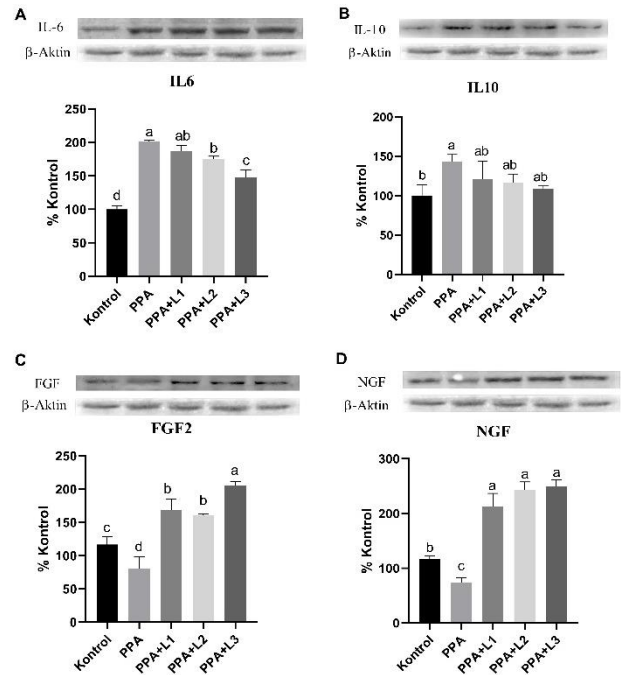
## İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapıldı (PRISM 8, GraphPad Software Inc, LaJolla, CA). Veriler;

ortalamanın standart hatası belirlenerek (± SEM) oluşturuldu. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Post hoc analizi olarak Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için P değeri <0.05 olarak belirlendi.

## BULGULAR

Beyin IL-6, IL-10, FGF-2, ve NGF seviyeleri Şekil 1'de (A-D) gösterilmiştir. Bu çalışmada, beyin IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (P<0,0001). Bununla birlikte PPA grubuna göre PPA+L1 grubunda IL-6 düzeylerinde azalma olmuş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0,5). Ancak IL-6 düzeylerindeki azalma PPA grubuna kıyasla PPA+L2 grubunda (P=0,0078), ve PPA+L3 grubunda (P<0,0001) belirgin olmuştur. Beyin IL-10 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla PPA verilen grupta belirgin olarak artmıştır (P =0,0209). Bununla birlikte PPA+L1, PPA+L2 ve PPA+L3 gruplarında kontrol ve PPA gruplarına kıyasla IL-10 düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (P> 0,05). FGF2 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla PPA grubunda anlamlı bir düşüş göstermiştir (P=0,281). Bununla birlikte, PPA+L1, PPA+L2 ve PPA+L3 gruplarında hem kontrole göre (sırasıyla: P=0,0024; P=0,0080; P<0,0001), hem de PPA grubuna göre (tümü için: P<0,0001), istatistiksel olarak belirgin FGF2 artışı saptanmıştır. Beyin NGF düzeyleri bakımından kontrol grubuna kıyasla PPA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır (P=0,295). Ayrıca, PPA+L1, PPA+L2 ve PPA+L3 gruplarında hem kontrole göre (tümü için: P<0,0001), hem de PPA grubuna göre (tümü için: P<0,0001) istatistiksel olarak belirgin NGF düzeyi artışı tespit edilmiştir.



**Şekil 1.** Propiyonik asit (PPA) ile indüklenen otizm spektrum bozukluğu (OSB) modelinde artan dozda likopen (L) uygulamasının; (A) İnterlökin 6 (IL6), (B) İnterlökin 10 (IL10), (C) Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2), ve (D) Sinir büyüme faktörü (NGF) düzeyleri üzerine etkileri. Western blot bant yoğunlukları, dansimetrik yöntemle ve kontrolün yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. Deney grupları arasında ortak bir harf (a-d) bulunmayan barlar farklıdır (P<0.05).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Likopen, insan vücudu için önemli faydaları olan ve ilk olarak reaktif oksijen radikallerine tepki veren, ikincil olarak ise de-toksifikasyon enzimlerinin etkilerini güçlendiren karotenoid bir fitokimyasaldır ve bu etkilerine ek olarak hücre döngüsüne etkiyerek apoptozu arttırmak suretiyle kanserleşmeyi önleyebildiği ve MSS hastalıklarında nöroprotektif etkinlik gösterebildiği bildirilmektedir (11, 13). Bu çalışma likopen takviyesinin üç haftalık yaşta yavru sıçanların beyinde PPA uygulaması ile oluşturulan otizm spektrum bozukluğu modelinde, inflamatuvar moleküler belirteçler IL-6, IL-10, ayrıca fibroblast ve nöronal büyüme faktörleri FGF2 ve NGF üzerindeki etkilerini aydınlatmayı amaçlamıştır. PPA, bağırsakta bulunan mikropların fermantasyonla ürettikleri bir metabolit olup, sıçanlarda deri altına 500 mg / kg PPA uygulanması sonucunda PPA'nın nöral hücre organizasyonunu bozmaya neden olduğu bildirilmektedir (17). Likopen, oksidatif stresi önleyerek sinir sistemini koruyabilir çünkü lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (18). Ayrıca likopenin, sıçanlarda kolşisinle oluşturulan mito-oksidatif tahribata karşı öğrenme ve hafıza bozukluğunu koruma özelliğine sahip olduğu da bildirilmektedir (19). Bu çalışmada likopenin özellikle 10 ve 20 mg/kg dozlarında tüketildiği sıçan gruplarında PPA uygulamasıyla kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu görülen beyin dokusu IL-6 ve IL-10 seviyelerinde PPA grubuna nazaran belirgin azalış görülmektedir. Yakın zamanlı yapılan ve 2487 OSB'li kişinin değerlendirildiği bir meta-analiz çalışmasında, bu bireylerde interferon - gamma (IFN -  $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (20). Çalışmamızda deneysel olarak PPA uygulamasıyla kontrol grubuna göre belirgin şekilde artan inflamatuvar sitokin düzeyleri bu meta-analiz çalışmasıyla da benzerlik arz etmektedir. Ayrıca, Li ve ark. (21), likopen tedavisinin farelerde proinflamatuvar sitokinlerdeki (IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ ) artışı inhibe edebildiğini bildirmektedir. Bizim çalışmamızda da IL-6 ve IL-10 seviyelerindeki PPA nedenli artışın, likopen takviyesindeki artışa paralel olarak bu çalışmalarda bildirilen verilere uyumlu şekilde inhibe olduğu görülmektedir.

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), normal gelişim için çok önemli unsurlar içeren çok çeşitli süreçlerde yer alan bir hücre sinyal proteinleri ailesidir. İşlevlerindeki herhangi bir düzensizlik, bir dizi gelişimsel kusurlara yol açar. Bu büyüme faktörleri genellikle, hücre yüzeyi reseptörlerini aktive eden hücre dışı kaynaklı sistemik veya lokal olarak dolaşan moleküller olarak hareket eder (22). Bizim çalışmamızda PPA uygulamasının, her ne kadar kontrol grubuna kıyasla FGF2 seviyelerinde anlamlı bir fark oluşturmasa da, likopen takviye edilen gruplarda anlamlı artışlar göstermiştir. FGF ailesinin temel üyesi olan FGF-2'nin, sinaptogenez ve nöronal dalanma dâhil olmak üzere çok yönlü yapısal plastisiteye aracılık ettiği iyi bilinmektedir (23). Çalışmamızdaki FGF2 düzeyi artışına benzer bir şekilde zeytinyağı ile zenginleştirilmiş bir diyetle beslenen sıçanların farklı beyin bölgelerinde FGF mRNA düzeylerinde artış, beyin oksidatif hasarında azalma ve farelerin farklı yaşam evrelerindeki beyin nörotrofik faktör gen ekspresyonlarında iyileşme olduğu bildirilmektedir (24).

Sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofik bir faktördür ve esas olarak belirli hedef nöronların büyümesinin, muhafazasının, proliferasyonunun ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde rol oynayan nöropeptidlerdendir (25). Çalışmamızda likopen uygulaması ile PPA indüklenen gruplarda istatistiksel olarak belirgin NGF artışı saptanmıştır. Bulgularımız, NGF düzeylerinin likopen uygulamasıyla beyinde hiperlipideminin neden olduğu hasara karşı koruyucu etkinliğinin kanıtlandığı ve likopenin IL-1 ve TNF- $\alpha$  düzeylerini düşürürken NGF oranlarını da arttırdığı başka bir çalışmanın bulgularına paralellik arz etmektedir (26). Ayrıca yine bir başka çalışmada NGF düzeylerinin artışının, yeni doğan sıçan yavrularında beyin hipoksik iskemik hasara karşı korunmasında etkili olduğu bildirilmiştir (27). Yine likopen gibi karotenoid ailesinden olan askantinin akut serebral infarkt oluşturulan bir sıçan modelinde, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığı ve beyin dokusundaki malondialdehit içeriğini azalttığı, ayrıca beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve NGF mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (28).

Sonuç olarak, 3 haftalık yaşta genç yavru sıçanlarda, propiyonik asit ile oluşturulan otizm spektrum bozukluğu modelinde, 5, 10 veya 20 mg/kg dozunda verilen likopen, beyinde inflamasyon belirteci sitokinlerin (IL6 ve IL10) düzeylerini belirgin şekilde azaltmış, ayrıca FGF ve NGF düzeylerini belirgin şekilde arttırmıştır. Likopenin OSB ve benzeri nöropatolojik bozukluklarda çeşitli tedavi edici veya önleyici potansiyeli moleküler anlamda ortaya konularak ileri çalışmalar planlanabilir.

## KAYNAKLAR

1. Mirza R, Sharma B. (2018). Selective Modulator of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-A Protects Propionic Acid Induced Autism-Like Phenotypes in Rats. *Life Sci.* 214: 106–117.
2. Bhandari R, Kuhad A. (2015). Neuropsychopharmacotherapeutic Efficacy of Curcumin in Experimental Paradigm of Autism Spectrum Disorders. *Life Sci.* 141: 156–169.
3. Shultz SR, Aziz NAB, Yang L, Sun M, MacFabe DF, O'Brien TJ. (2015). Intracerebroventricular Injection of Propionic Acid, an Enteric Metabolite Implicated in Autism. Induces Social Abnormalities That Do Not Differ between Seizure Prone (FAST) and Seizure-Resistant (SLOW) Rats. *Behav Brain Res.* 278: 542–548.
4. El-Ansary A, Al-Ghamdi M, Bhat RS, Al-daihanSooad AL. (2016). Potency of Pre-Post Treatment of Coenzyme Q10 and Melatonin Supplement in Ameliorating the Impaired Fatty Acid Profile in Rodent Model of Autism. *Food Nutr Res.* 60: 10.
5. Xu FL, Fan T, Duan JJ, Chen D. (2012). Clinical Analysis of Organic Acidemia in Neonates from Neonatal Intensive Care Units. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 14: 336–339.
6. Khalil SR, Abd-Elhakim YM, Selim ME, Al-Ayadhi LY. (2015). Apitoxin Protects Rat Pups Brain from Propionic Acid-Induced Oxidative Stress: The Expression Pattern of Bcl-2 And Caspase-3 Apoptotic Genes. *Neuro Toxicology.* 49: 121–131.
7. Gupta R, Deshpande SB. (2008). 3-Nitropropionic Acid Depresses Spinal Reflexes Involving GABA Ergic and Glycinergic Transmission in Neonatal Rat Spinal Cord in Vitro. *Life Sci.* 83: 756–760.
8. Shultz SR, MacFabe DF, Ossenkopp KP, Scratch S, Whelan J, Taylor R, Cain DP. (2008). Intracerebroventricular Injection of Propionic Acid, an Enteric Bacterial Metabolic and Product,

- Impairs Social Behavior in the Rat: Implications for an Animal Model of Autism. *Neuropharmacology*. 54: 901–911.
9. Thomas RH, Foley KA, Mephram JR, Tichenoff LJ, Possmayer F, MacFabe DF. (2010). Altered Brain Phospholipid and Acylcarnitine Profiles in Propionic Acid Infused Rodents; Further Development of a Potential Model of Autism Spectrum Disorders. *J Neurochem*. 113: 515–529.
  10. Heber D, Lu QY. (2002). Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Exp Biol Med (Maywood)*. 227: 920–923.
  11. Sahin K, Gencoglu H, Bilir B, Kucuk O. (2018). The Liver. (İçinde): Chapter 14 - Protective Role of Lycopene against Oxidative Stress in Liver. Patel VB, Rajendram R, Preedy VR (editörler). Cilt 1. Baskı 1. s. 155–67. Academic Press. Boston, ABD. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9.00014-8>.
  12. Yu L, Wang W, Pang W, Xiao Z, Jiang Y, Hong Y. (2017). Dietary Lycopene Supplementation Improves Cognitive Performances in Tau Transgenic Mice Expressing P301L Mutation via Inhibiting Oxidative Stress and Tau Hyperphosphorylation. *J Alzheimers Dis*. 57: 475–482.
  13. Chen D, Huang C, Chen Z. (2019). Review: A review for the Pharmacological Effect of Lycopene in Central Nervous System Disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111: 791–801.
  14. Lei X, Lei L, Zhang Z, Cheng Y. (2016). Neuroprotective Effects of Lycopene Pretreatment on Transient Global Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats: The Role of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Mol Med Rep*. 13: 412–418.
  15. Hu W, Wang H, Liu Z, Liu Y, Wang R, Luo X, Huang Y. (2017). Neuroprotective Effects of Lycopene in Spinal Cord Injury in Rats via Antioxidative and Anti-Apoptotic Pathway. *Neurosci Lett*. 642: 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.004>.
  16. Liu CB, Wang R, Yi YF, Gao Z, Chen YZ. (2018). Lycopene Mitigates B-Amyloid Induced Inflammatory Response and Inhibits NF-Kb Signaling at the Choroid Plexus in Early Stages of Alzheimer's Disease Rats. *J Nutr Biochem*. 53: 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.014>.
  17. Choi J, Lee S, Won J, Jin Y, Hong Y, Hur TY, Kim JH, Lee SR, Hong Y. (2018). Pathophysiological and Neurobehavioral Characteristics of a Propionic Acid-Mediated Autism-Like Rat Model. *PLoS One*. 13: e0192925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192925>.
  18. El Morsy EM, Ahmed M. (2020). Protective Effects of Lycopene on Hippocampal Neurotoxicity and Memory Impairment Induced by Bisphenol a in Rats. *Hum Exp Toxicol*. 39(8): 1066-1078. <https://doi.org/10.1177/0960327120909882>.
  19. Prakash A, Kumar A. (2013). Lycopene Protects against Memory Impairment and Mito-Oxidative Damage Induced by Colchicine in Rats: An Evidence of Nitric Oxide Signaling. *Eur J Pharmacol*. 721: 373-381. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.016>.
  20. Saghazadeh A, Ataieina B, Keynejad K, Abdolalizadeh A, Hirbod-Mobarakeh A, Rezaei N. (2019). A meta-analysis of Pro-Inflammatory Cytokines in Autism Spectrum Disorders; Effects of Age, Gender, and Latitude. *J Psychiatr Res*. 115: 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.05.019>.
  21. Li F, Xiang H, Lu J, Chen Z, Huang C, Yuan X. (2020). Lycopene Ameliorates PTSD-Like Behaviors in Mice and Rebalances the Neuroinflammatory Response and Oxidative Stress in the Brain. *Physiol Behav*. 224: 113026. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113026>.
  22. Ornitz, DM, Itoh N. (2015). The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Dev Biol*. 4(3): 215–266.
  23. Reuss B, von Bohlen und Halbach O. (2003). Fibroblast Growth Factors and Their Receptors in the Central Nervous System. *Cell Tissue Res*. 313: 139-157.
  24. Pase CS, Teixeira AM, Roversi K, et. al. (2015). Olive Oil-Enriched Diet Reduces Brain Oxidative Damages and Ameliorates Neurotrophic Factor Gene Expression in Different Life Stages of Rats. *J Nutr Bioch*. 26(11): 1200–1207.
  25. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. (2012). Nerve Growth Factor: from the Early Discoveries to the Potential Clinical Use. *J Transl Med*. 10:239.
  26. Yang W, Shen Z, Wen S, Wang W, Hu M. (2018). Mechanisms of Multiple Neurotransmitters in the Effects of Lycopene on Brain Injury Induced by Hyperlipidemia. *Lipids Health Dis*. 17: 13.
  27. Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. (1996). Nerve Growth Factor Protects the Neonatal Brain against Hypoxic-Ischemic Injury. *Ann Neurol*. 39(1): 114–122.
  28. Nai Y, Liu H, Bi X, Gao H, Ren C. (2018). Protective Effect of As-taxanthin on Acute Cerebral Infarction in Rats. *Hum Exp Toxicol*. 37(9): 929–936.
  29. National Research Council (US). (1995). Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition*. Washington (DC): National Academies Press (US).

✉ **Sorumlu Yazar:**

Kazim ŞAHİN

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 23119 Elazığ, TÜRKİYE  
E-mail: ksahin@firat.edu.tr