



**FETAL VE PUBERTAL DÖNEMDE ENDOTOKSİN MARUZİYETİNİN
DİŞİ SİÇANLARDA ENFLAMATUVAR VE OKSİDATİF
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Hilal YILDIRIM

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

Yüksek Lisans Tezi – 2016

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FETAL VE PUBERTAL DÖNEMDE ENDOTOKSİN MARUZİYETİNİN DİŞİ
SIÇANLARDA ENFLAMATUVAR VE OKSİDATİF PARAMETRELER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Hilal YILDIRIM

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 153/2011 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2016**

İTHAF

Bu çalışmayı her zaman yanımda olan sevgili ailem, kardeşim Şeyma Fırat ve hayat arkadaşım Selim Yıldırıma ithaf ediyorum.



KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Hilal YILDIRIM**'ın "**Fetal ve Pubertal Dönemde Endotoksin Maruziyetinin Dişi Sıçanlarda Enflamatuvar ve Oksidatif Parametreler Üzerine Etkisi**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/08/2016

SEKİLLER DİZİNİ..... XI

TABLolar DİZİNİ..... XIV

1. GİRİŞ..... 1

2. GENEL BİLGİLER..... 2

2.1. Lipopolisakkarit..... 2

2.1.1. LPS ve Gebelik..... 3

2.1.2. Prenatal LPS ve Postnatal Yavrular Üzerine Etkileri..... 4

2.1.2.1. Tekrarlanan LPS..... 12

2.2. Interleukin-1 Beta (IL-1β)..... 14

2.2.1. TNF-α..... 15

2.2.2. TNF-α..... 16

2.2.3. TNF-α..... 17

3. MATERYAL VE METOT..... 21

3.1. Etik Kurul Onayı..... 21

3.2. Deneysel Hayvanları..... 21

3.3. Deneysel Grupları..... 21

3.4. Enjeksiyon Protokolleri..... 22

3.4.1. LPS Uygulanması..... 22

3.4.2. Serum Fizyolojik Uygulanması..... 22

3.5. Serum TNF-α Düzeylerinin Saptanması..... 23

3.6. Serum IL-1β Düzeylerinin Saptanması..... 24

3.7. Serum Kortikosteron Düzeylerinin Saptanması..... 25

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

3.9.1. Superoksid Dismutaz (SOD) Tayini..... 27

3.9.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Miktarının Tayini..... 28

3.9.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini..... 29

3.9.4. Doku Homojenizat ve Sıvıların Sıvı Tayini..... 29

3.9.5. GSH Analizi..... 30

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Fırat Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Süleyman SANDAL
İnönü Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Sedat YILDIZ
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Lipopolisakkarit.....	2
2.1.1. LPS ve Gebelik.....	3
2.1.2. Prenatal LPS ve Postnatal Yavrular Üzerine Etkileri.....	4
2.1.2.1. Tekrarlanan LPS.....	12
2.2. Interleukin-1 Beta (IL-1 β).....	14
2.3. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α).....	15
2.4. Kortikosteron.....	15
2.5. Oksidatif Stres.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Etik Kurul Onayı.....	21
3.2. Deney Hayvanları.....	21
3.3. Deney Grubu.....	21
3.4. Enjeksiyon Protokolü.....	22
3.4.1. LPS Uygulanması.....	22
3.4.2. Serum Fizyolojik Uygulanması.....	22
3.5. Serum TNF- α Düzeylerinin Saptanması.....	23
3.6. Serum IL-1 β Düzeylerinin Saptanması.....	24
3.7. Serum Kortikosteron Düzeylerinin Saptanması.....	25
3.8. Karaciğer, Böbrek, Kalp Dokularının Analizlere Hazırlanması.....	26
3.9. Karaciğer, Böbrek, Kalp Dokularında Yapılan Analizler.....	27
3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini.....	27
3.9.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini.....	28
3.9.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini.....	29
3.9.4. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini.....	29
3.9.5. GSH Analizi.....	30

3.10. Hematolojik Parametreler	30
3.11. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Canlı ve Organ Ağırlıklarının Değişimi.....	33
4.2. Hematolojik Parametreler.....	35
4.3. Hormonal Parametreler ve Sitokinler.....	40
4.4. Oksidatif Stres Parametreleri.....	42
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	62
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	62
EK.2. ETİK KURUL ONAYI.....	63

TEŐEKKÜR

Tecrübeleriyle sadece bu çalışmaya değil hayatımda ışık tutan model hocam sayın Prof. Dr. Sedat YILDIZ'a,

Pratik bilgileri ile çalışmaya destek olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Alaadin POLAT'a,

İstatistik bilgileriyle tezimin oluşmasına yardımcı olan Prof. Dr. Saim YOLOęLU ve ArŐ. Grv. Ahmet Kadir ARSLAN'a

Yardım eli s¼rekli ¼zerimde olan değerli hocam sayın Yrd. Doç. Zekeriya ÇALIŐKAN'a

Tez çalıŐmamda yardımcı olan ve her daim yanımda olan bildiklerini esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarım ArŐ. Grv. Tuba TAPAN'a ve ArŐ. Grv. Kevser TANBEK'e,

Manavi destek ve bilgi sağlayan sevgili asistan arkadaşlarım Pınar ÇAKAN' a ve Cihat UÇAR'a,

Hayatım boyunca beni destekleyen, sevgiyle gelişimime katkıda bulunan sevgili aileme,

Projenin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Sonsuz teŐekk¼r ederim.

ÖZET

Fetal ve Pubertal Dönemde Endotoksin Maruziyetinin Dişi Sıçanlarda Enflamatuvar ve Oksidatif Parametreler Üzerine Etkisi.

Amaç: Fetal ve pubertal dönemde endotoksin (veya lipopolisakkarit, LPS) maruziyetinin enflamatuvar ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri bilinmemektedir. Mevcut tezin amacı, fetal ve pubertal dönemlerde endotoksinlere maruz kalan sıçan yavrularında hematolojik parametreler, TNF-alfa, IL-1beta, kortikosteron, LH ve FSH düzeyleri ile doku oksidatif stres düzeylerini incelemektir.

Materyal ve metot: Sıçanlara gebeliklerinin 17-18. günlerinde (fetal dönem) steril salin (n=5) veya endotoksin (n=5, *Escherichia coli*, 50 µg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Doğan dişi yavrular, postnatal 60. günde (pubertal dönem) iki gruba ayrılarak steril salin (SF, n=17) veya endotoksin (LPS, n=17) enjekte edildi ve toplam dört deneysel grup oluşturuldu (SF+SF, SF+LPS, LPS+SF ve LPS+LPS). Pubertal dönemde yapılan enjeksiyonlardan 4 saat sonra deney sonlandırılarak kan ve doku örnekleri alındı. Hematolojik parametreler, kortikosteron, LH, FSH, IL-1beta, TNF-alfa düzeyleri kanda; oksidatif stress parametreleri (SOD, CAT, MDA, GSH) ise böbrek, kalp, karaciğer dokularında incelendi.

Bulgular: Nötrofil % oranı SF+SF grubunda SF+LPS, LPS+SF ve LPS+LPS gruplarına göre daha düşüktü (p=0.001). Kortikosteron, LH ve FSH düzeyi gruplar arasında farklı değilken TNF-alfa düzeyi LPS+LPS grubunda SF+SF ve LPS+SF gruplarından daha yüksekti (p=0.005). IL-1beta düzeyi ise SF+LPS grubunda SF+SF ve LPS+SF gruplarından daha yüksekti (p<0.05). Kalp dokusunda SOD düzeyi, LPS+SF grubu diğer gruplardan daha düşüktü (p=0.000)

Sonuç: Elde edilen bulgular: (1) prenatal ve pubertal endotoksin maruziyetinin, hipotalamo-pituiter-adrenal ve -gonadal eksen aktivitelerini etkilemeksizin nötrofil sayısını artırdığını; (2) endotoksinlere karşı pubertal TNF-alfa yanıtının prenatal programlamaya bağlı olduğunu fakat IL-1 beta düzeyi için böyle bir programlamanın söz konusu olmadığını; (3) oksidatif stres parametrelerinin ise SOD dışında prenatal ve pubertal endotoksin maruziyetinden etkilenmediğini göstermiştir.

Anahtar Kelime: Maternal maruziyet, endotoksin, oksidatif stress, yangı, sıçan

ABSTRACT

Investigation of Inflammatory and Oxidative Parameters in Female Rats Exposed to Endotoxins During Fetal and Pubertal Period

Aim: Effects of fetal and pubertal edotoxin exposure (or lipopolysaccharide, LPS) on inflammatory and oxydative stress parameters are not known. Aim of the current thesis was to investigate the effects of fetal and pubertal endoxin exposure on hematological parameters, TNF-alpha, IL-1beta, corticosterone, LH and FSH levels and tissue oxydative stress parameters in female rat pups.

Material and method: Rats were injected intraperitoneally sterile saline (n=5) or endotoxin (n=5) on days 17-18 of pregnancy. Following birth, female pups were subdivided into two groups and injected either strerile saline (SF, n=17) or endotoxin (LPS, n=17) on postnatal day 60 and four experimental groups were formed (SF+SF, SF+LPS, LPS+SF ve LPS+LPS). Blood and tissue samples were taken 4 hours postinjection at prepubertal period. Hematologic parameters, corticosterone, IL-1beta, TNF-alpha were determined in blood; and oxidative stress parameters were studied in kidney, heart and liver of tissues.

Results: Neutrophil % ratio of SF+SF group was lower than SF+LPS, LPS+SF and LPS+LPS groups (p=0.001). Corticosterone, LH and FSH levels were not differentbetween the groups but TNF-alpha level of LPS+LPS groups was higher than SF+SF and LPS+SF groups (p=0.005). IL-1beta level of SF+LPS group was however higher than SF+SF and LPS+SF groups (p<0.05). Heart tissue SOD levels in the LPS+SF groups was lower than the others groups (p=0.000).

Conclusion: This results obtained suggest that (1) prenatal and pubertal endotoxine exposure increases neutrophil count without affecting hypothalamo-pituitary-adrenal and –gonadal axes, that (2) TNF-alpha response against endotoxins was due to prenatal programming whereas there was no such a programming for IL-1beta, that (3) oxydative stress parameters, except SOD level, were not affected by prenatal or postnatal endoxin exposure.

Key words: Maternal exposure, endotoxin, oxydative stress, inflammation, rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
A _K	: Kör absorbanı
A _N	: Numune absorbanı
A _{st}	: Standardın absorpsiyonu
AT1	: Anjiyotensin II tip 1
AT2-R	: Anjiyotensin II resöptör
BSA	: Sığır serum albümini
CAT	: Katalaz
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı faktör
CuCl ₂	: Bakır 2 klorür
CuSO ₄	: Bakır 2 sülfat
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ELİSA	: Enzime bağlı immünosorban yöntem
FCF	: Folin-ciocalteu-fenol
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
g	: Gram
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
HPA	: Hipotalamik-hipofizyal-adrenokortikal
HPG	: Hipotalamik-hipofiz-gonad
ICE	: İnterlokın-1 konvertaz enzim
IgE	: İmmüno globin E
IL-1 β	: İnterlokın-1 beta
IL-6	: İnterlokın-6
İp	: İnter peritoneal
k	: Reaksiyon hız sabiti
KC	: Kemokin keratinosit
Kg	: Kilogram
K _{st}	: Standardın konsantrasyonu
LBP	: Lipopolisakkarit bağlayan protein
LH	: Lüteinizan hormon
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Monosit kemotaktik Protein-10
MDA	: Malondialdehit
MIP-1B	: Makrofaj enflamatuar protein
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Messenger ribonükleik asit

Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NF- κB	: Nuklear faktor kappa beta
NF-κB,	: Nuclear factor kappa b
NK	: Natural killer
ng	: Nanogram
nm	: Nanomil
OVA	: Ovalbümin
Pg	: Pikogram
pmol	: Pikomol
sc	: Subkutan
SD	: Standart deviasyon
SF	: Salin
SOD	: Süperoksitdismutaz
SS	: Standart sapma
T	: Testosteron
TBA	: Tiobarbitürik
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri
TCA	: Triklorasetikasit
TLR-4	: Toll-like reseptor-4
TNF-α	: Tumor nekrozis faktor alfa
VP	: Vazopressin
XO	: Ksantin oksidaz
μL	: Mikrolitre
#	: Sayı
%	: Yüzde
μ ²	: Mikrokare
μg	: Mikrogram
μmol	: Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. LPS nin Moleküler Yapısı	2
Şekil 2.2. Gebelikte Bakteriyel Enfeksiyon ve Gebe Kalım Başarısı.....	3
Şekil 2.3. Gebelik ve Bakteriyel Enfeksiyonların Annenin Yem Tüketimi ve Ağırlık Değişimi Üzerine Etkisi	4
Şekil 2.4. Maternal LPS nin Gestesyonel Kilo Alımı Üzerine Etkisi.....	4
Şekil 2.5. Prenatal LPS nin Postnatal Yavru Üzerindeki Kortizol Değişimi.....	5
Şekil 2.6. Prenatal LPS nin Postnatal Testosteron , LH Üzerine Etkisi.....	6
Şekil 2.7. Prenatal Lps nin Postnatal Yavru Üzerindeki Kilo Alımına ve Üremeye Etkisi	6
Şekil 2.8. Prenatal LPS nin Fetal Beyinde IL-6 Seviyesi Üzerine Etkisi.....	8
Şekil 2.9. Maternal LPS nin Hipokampüsteki Hücre Sayısına Etkisi.....	8
Şekil 2.10. Maternal LPS nin Postnatal Sosyal ve Araştırma Davranışları Üzerine Etkisi.....	9
Şekil 2.11. Prenatal LPS nin Fetal Dentrik Sayısı Üzerine Etkisi.....	9
Şekil 2.12. Prenatal LPS nin Yavrunun Solunumu Üzerine Etkisi.....	10
Şekil 2.13. Prenatal LPS nin Solunum Sistemindeki Alerjenlere Karşı Postnatal Etkisi.....	11
Şekil 2.14. Prenatal LPS nin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Postnatal Etkisi.....	11
Şekil 2.15. Prenatal LPS nin Glomerus ve Kan Basıncı Üzerine Postnatal Etkisi..	12
Şekil 2.16. Prenatal ve Postnatal LPS nin mRNA Sitokin Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	13
Şekil 2.17. Prenatal ve Postnatal LPS nin Ağrıya Yanıt Olarak Kuyruk Çekme Süresi.....	14
Şekil 3.1. Deneysel Uygulama Şeması.....	22
Şekil 4.1. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Canlı Ağırlık Üzerine Etkileri.....	34
Şekil 4.2. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Karaciğer Ağırlığı Üzerine Etkileri.....	34

Şekil 4.3. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Karaciğer İndeksi Üzerine Etkileri.....	35
Şekil 4.4. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Hematokrit Düzeyi.....	37
Şekil 4.5. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Nötrofil Oranı.....	38
Şekil 4.6. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Lenfosit Oranı.....	38
Şekil 4.7. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Eozinofil Sayısı.....	39
Şekil 4.8. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Eozinofil Oranı.....	39
Şekil 4.9. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki IL-1 β Düzeyi.....	41
Şekil 4.10. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki TNF- α Düzeyi.....	41
Şekil 4.11. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Kalp Dokusunda SOD Üzerine Etkisi.....	43

Şekil 4.12. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Kalp Dokusunda CAT Üzerine Etkisi..... 44



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Yetişkin Erkek Yavruların Prenatal LPS Maruziyetinin Postnatal Yavru Üzerine, Üreme ve Cinsel Davranışı.....	7
Tablo 2.2. Prenatal Lipopolisakkarit, Postnatal Anne ve Yavru Üzerine Etkileri..	18
Tablo 3.1. Deney Grup ve Sayıları.....	21
Tablo 3.2. Serum TNF- α düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü.....	24
Tablo 3.3. Serum IL-1 β Düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü.....	25
Tablo 3.4. Serum Kortikosteron Düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü.....	26
Tablo 3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini Test Protokolü.....	28
Tablo 3.6. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini Test Protokolü.....	28
Tablo 3.7. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini Test Protokolü.....	29
Tablo 3.8. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini Test Protokolü.....	30
Tablo 4.1. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Canlı Ağırlık (g) ve Organ Ağırlıkları (g) Üzerine Etkileri.....	33
Tablo 4.2. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Hematolojik Parametre Değerleri.....	36
Tablo 4.3. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğinde Hormonal Parametreler Ve Sitokinlerin Değerlendirilmesi.....	40
Tablo 4.4. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Organlarda Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkileri.....	42

1. GİRİŞ

Bakteriler ile konakçı arasında kommensalist/mutualist bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin konakçı aleyhine bozulması durumunda hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonlar bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde uyararak yangısal reaksiyonlara yol açarlar (1). Bu yanıtlar içerisinde kan parametrelerinin değişimi, çeşitli hormonal yanıtlar ve interlökin 1beta (IL-1beta) ve Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF-alfa) gibi enflamatuvar parametrelerde meydana gelen değişimler yer almaktadır (2). Ayrıca, enfeksiyonlar konakçıyı oksidatif strese sokmakta ve malondialdehid gibi oksidatif parametreler artış gösterirken antioksidanlar ise azalmaktadır (3, 4). Akyuvarların sayıları ve tipleri de bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak değişiklikler göstermektedir (5). Tüm bu olaylar konakçının bu patojenlere karşı savaşımını etkilemekte ve hastalık veya sağlığa geri dönmeyi sağlamaktadırlar.

Prenatal dönemdeki enfeksiyonların postnatal veya erişkinlik dönemindeki enfeksiyonların gelişimi üzerine etkileri pek bilinmemektedir. Fakat görünen o ki, gebelik sürecinde anneye uygulanan bazı stres faktörleri, doğan yavrularda çeşitli sorunlara yol açmaktadır (6). Fetal programlama olarak bilinen bu durumun enfeksiyonlara karşı yanıtı da modifiye edebileceği düşünülmektedir (6, 7).

Bakteriyel enfeksiyon modeli olarak bakteriyomimetikler olarak da adlandırılan bakteri hücre zarı duvarı (lipopolisakkarit, LPS) kullanılmaktadır. Lipopolisakkaritler intraperitoneal olarak enjekte edildiklerinde IL-1beta ve TNF-alfa artışlarına yol açarak yangısal bir yanıt oluşumunu sağlarlar (2). Bu tür yanıtlarda oksidatif stres parametrelerinin de değiştiği belirlenmiştir (3, 4). Bu bağlamda örneğin LPS'lerin oksidatif markerları artırdıkları antioksidantları ise düşürdükleri belirlenmiştir (1). LPS enjeksiyonu kortikosteron salınımını da etkileyerek oluşan strese karşı savaşıma katkıda bulunmaktadır (8).

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Lipopolisakkarit

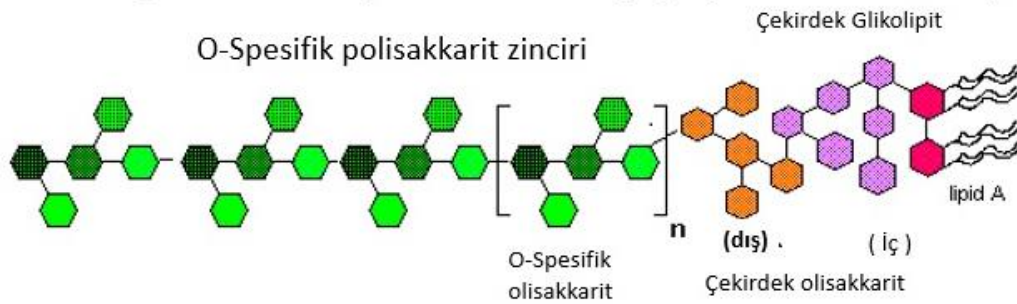
Gram- negatif bakterilerin hücre duvarının dış katmanına ait LPS, endotoksindir (9). Bu madde organizmaların neden olduğu hastalığın ateş ve şok (özellikle hipotansiyon) gibi birçok faktöründen sorumludur (9). lipopolisakkarite endotoksin adı verilmesinin nedeni, bakteri tarafından serbestçe salınan ekzotoksinlerin aksine hücre duvarının bütünleyici bir bölümü olmasıdır (9, 10). Endotoksinin patolojik etkileri, bunun türediği organizmanın kimliğinden bağımsız olarak hep aynıdır (10, 11).

LPS üç ayrı birimden oluşur (Şekil 2.1):

- (1) Toksik etkilerden sorumlu olan ve lipid A adı verilen bir fosfolipid
- (2) Lipid A'ya ketodeoksioktülonat üzerinden bağlanan beş şekerli bir öz polisakkaridi ve
- (3) 3-5 şekerlik birimlerin 25 kez yinelenmesinden oluşan bir dış polisakkarit. Bu dış polimer, laboratuvarında bazı organizmaların tiplendirilmesinde kullanılan, birçok gram negatif bakterinin önemli somatik veya O antijenidir (10, 11).

Lipopolisakkarit' tin birçok türü bulunmaktadır bunlara örnek; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, verilebilir (12). Bunlar gram-negatif bakteri türleridir fakat bunların içinde deneysel enflamatuvar yanıt ya da septik şok oluşturabilmek için daha çok *Escherichia coli* kullanılmaktadır (12, 13). *Escherichia coli*' nin farklı şuşları deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır, bunlar özellikle, O111: B4 O26: B6, O55: B5 gibi serotiplere sahiplerdir (9, 13).

Gram negatif bakteriyel endotoksin (Lipopolisakkarit,LPS)



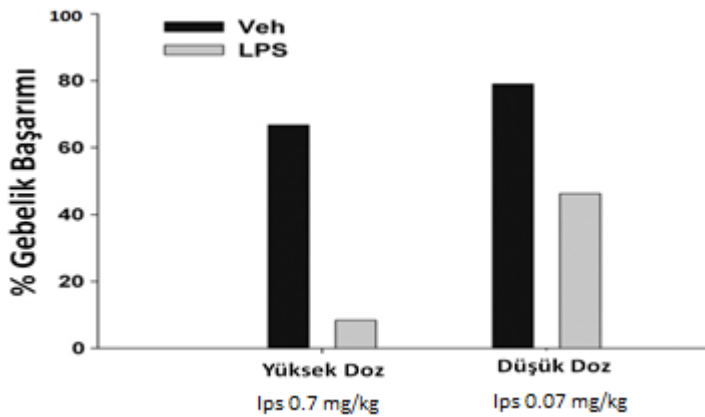
Şekil 2.1. LPS nin Moleküler Yapısı (14).

2.1.1. LPS ve Gebelik

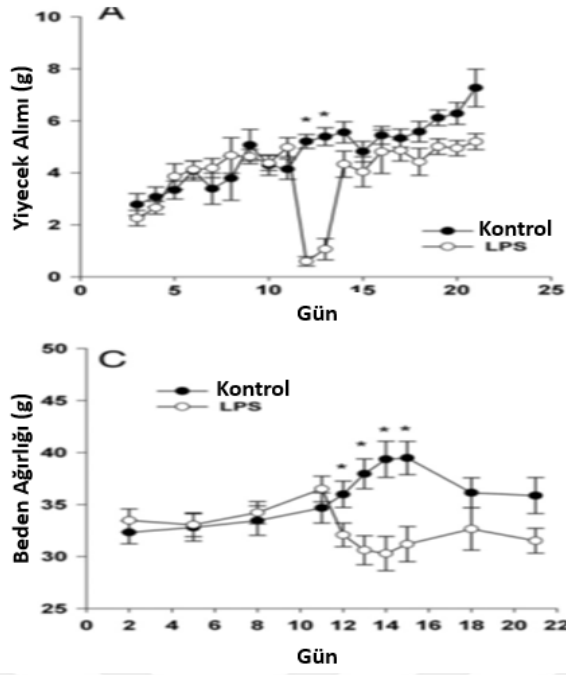
Lipopolisakkarit gram negatif bakteri hücre duvarının toksin bir komponentidir (9, 15). Genellikle düşük miktar gram negatif bakteriye maruz kalmak, herhangi bir sekel bırakmak ya da çok hafif rahatsızlıklara neden olur ama yüksek miktarda patojen bakterilere maruz kalındığında geri dönüşümsüz bozukluklara neden olmaktadır (16).

Sıklıkla, geçirilen bazı enfeksiyonlar, gastrointestinal distres, alkol tüketimi gibi birçok sebeplerden ötürü devamlı olarak düşük doz LPS'ye maruz kalılabilmekte fakat ağır tablolar meydana gelmemektedir (15). Aksine yüksek doz gram negatif bakteri enfeksiyonuna maruziyet, özelliklede gebelik döneminde bakteriyel vajinit ve diğer rahatsızlıklara sebep olabilmektedir (17). Bunun yanı sıra gebelik döneminde gram negatif bakteri enfeksiyonunun bulaşısı sonucu gebe kalım başarısında düşme, embriyonik rezarpsiyon, konjenital terotogenez (kusurlu organ, doku oluşumu, hasar şekil bozukluğu), fetal kayıplar, fetal büyüme geriliği, erken doğum, iskelet gelişimi gerilemeleri gibi sorunlar hem insanlarda hemde kemirgenlerde görülmektedir (18, 19).

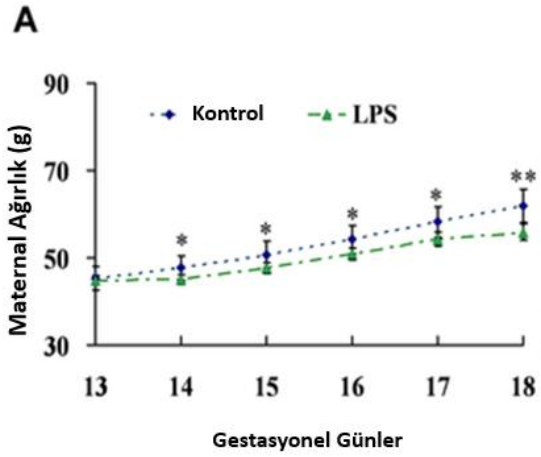
Bunun yanı sıra gebe kemirgen/sıçanlar da gram negatif bakteriyel enfeksiyona maruz kalmak birtakım sorunlara yol açmaktadır, bunların başlıcaları; anneliğe ait davranışlarda azalma, genel aktivitede düşme, annenin beden ağırlığında kayıp, prenatal anne ölümlerinde artış ve anne sıçanın yavrusunu isteme, koruma ve bakım sağlamadaki dürtüsel davranışlarda azalma, başarılı üremenin göstergesi olan batın büyüklüğünde küçülme gözlenmiştir (20, 21) . Serum ve amniyotik sıvıda TNF- α , IL-1B , IL-6 gibi sitokinlerin seviyesinde artış bulunmuştur (22).



Şekil 2.2. Gebelikte Bakteriyel Enfeksiyon ve Gebe Kalım Başarısı (22).



Şekil 2.3. Gebelik ve Bakteriye Enfeksiyonların Annenin Yem Tüketimi ve Ağırlık Değişimi Üzerine Etkisi (21).



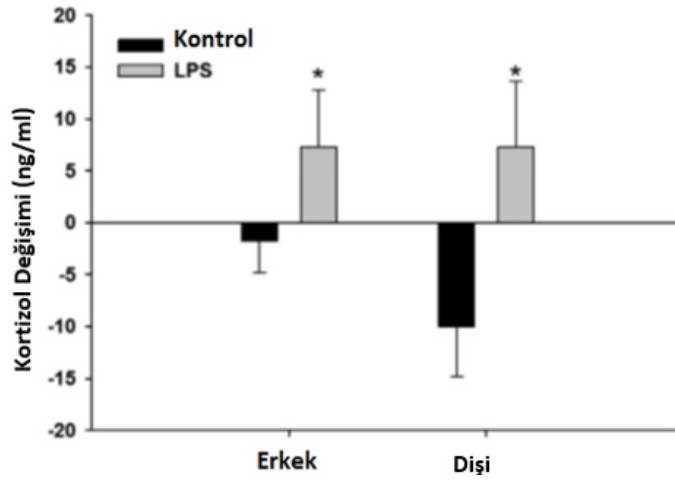
Şekil 2.4. Maternal LPS nin Gestasyonel Kilo Alımı Üzerine Etkisi (15).

2.1.2. Prenatal LPS ve Postnatal Yavrular Üzerine Etkileri

Artan çalışmalara göre yavruların fenotipi genetik faktörlerden daha fazla diğer faktörlerden etkilenmektedir (21). Özellikle maternal etkiler yavruların hayatta kalımını, gelişimini, fizyolojisini ve davranışlarını etkileyen en önemli faktördür (23). Viral ya da

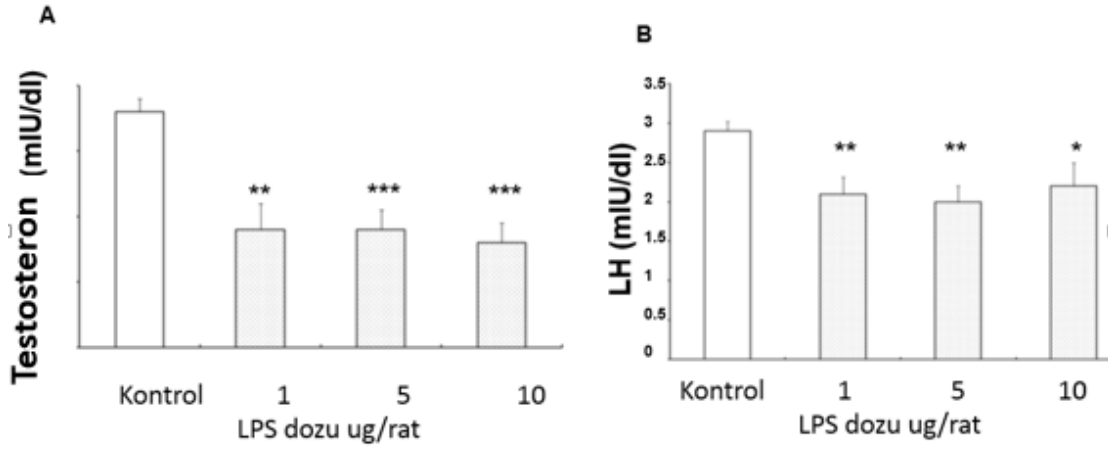
bakteriyel mikroorganizmalar gibi yaygın çevresel patojenler maternal immun cevabı değiştirebiliyor (21, 23). Maternal immun cevap çok çeşitli yollarla prenatal çevreyi değiştirme potansiyeline sahiptir (10). Sadece bakteriyel ve viral yollarla prenatal çevre etkilenmemekte bunun yanısıra maternal dönemde besin/enerji alımı oksijen seviyesi hormon konsantrasyonu gibi etmenlerde yavruların gelişimini farklılaştırmaktadır (24).

French ve ark. yaptığı çalışmaya göre prenatal uygulanan LPS, yetişkin yavruların davranışları ile ilişkili önemli endokrin değişime sebep olmuştur (21). Gebelik döneminde LPS ye maruz kalan yavruların stres cevap olarakta bilinen kortizol seviyesi kontrollere göre oldukça artmıştır (21). LPS ye prenatal maruz kalan yavrularda artan kortizol seviyesine paralel, kavgaya eğilim, kavga esnasında ısırma sıklığı, savunma davranışlarında artış ile aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur (21).



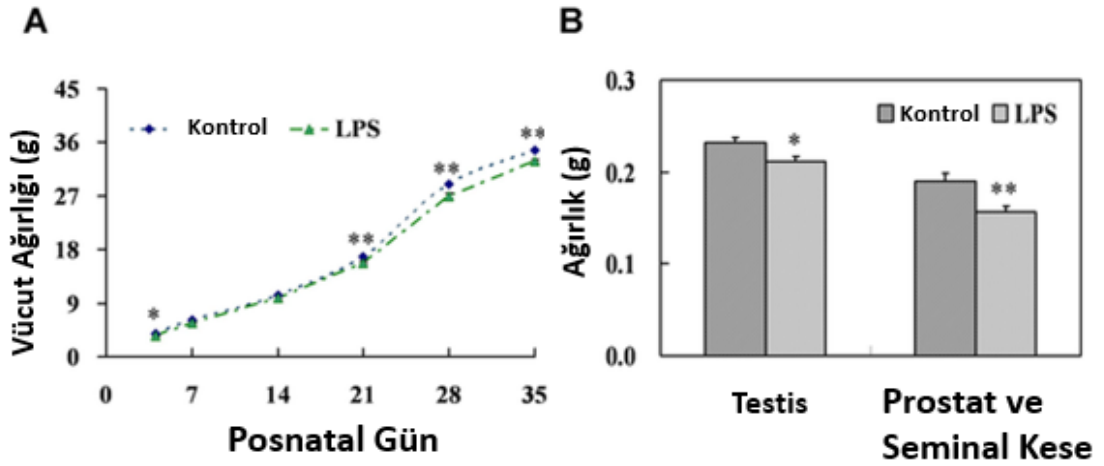
Şekil 2.5. Prenatal LPS nin Postnatal Yavru Üzerindeki Kortizol Değişimi (21).

Gebelik döneminde maternal enfeksiyonlar yavruların sexual davranışları ve hipofiz-gonad hormon serum seviyesini etkileyerek, bunların değişmesinde risk faktörüdür (24, 25). Solati ve ark. yaptığı çalışmaya göre prenatal LPS yetişkin yavrularda sexuel davranışların ve LH ile testosteron serum konsantrasyonlarının azalmasına neden olmuştur (26). Buna göre gebelik döneminde LPS' ye maruziyet artıca proenflamatuar sitokin seviyesinde artış görülür bu durumda nöroendokrin sistem etkilenip üreme davranışları bastırıp, *hipotalamik-hipofiz-gonad (HPG)* axisinin reaktivasyonuna sebep olduğu söylenebilir (26).



Şekil 2.6. Prenatal LPS nin Postnatal Testosteron, LH Üzerine Etkisi (26).

Yine Bernardi, Wang ve ark. yaptığı benzer çalışmalar ile prenatal LPS maruziyeti yavrular üzerinde birçok bozukluğa sebep olduğu ortaya konulmuştur (15, 20). Bunlardan kısaca bahsetmek gerekirse; beden ağırlığında düşüş, anogenital aralığın gününe göre uygun olmaması, erkeklerde inmemiş testis, sexuel davranışlarda bozulma, ejakülasyonun azalması, testis ağırlığında azalma, testiküler gelişim ve sperogenezde bozulma, sperm sayısında azalma gibi bozukluklardır (15, 20).



Şekil 2.7. Prenatal LPS nin Postnatal Yavru Üzerindeki Kilo Alımına ve Üremeye Etkisi (15).

Tablo 2.1. Yetişkin Erkek Yavruların Prenatal LPS Maruziyetinin Postnatal Yavru Üzerine Üreme ve Cinsel Davranışı (26). (Mean±SD)

	Kontrol	LPS	LPS	LPS
		1 (µg/rat)	5 (µg/rat)	10 (µg/rat)
Koklama Sayısı	16±1.6	8.18±0.78*	7.38±0.86**	6.10±1.1***
Takip Sayısı	10.78±0.72	6.87±1.5	4.81±8.8**	4.25±0.64**
Kur Sayısı	4.31±0.6	1.7±0.67	1.25±0.44*	1.25±0.31*
Çiftleşme Sayısı	0.8±0.1	0.5±1.16	0.2±0.13**	0.3±0.21**

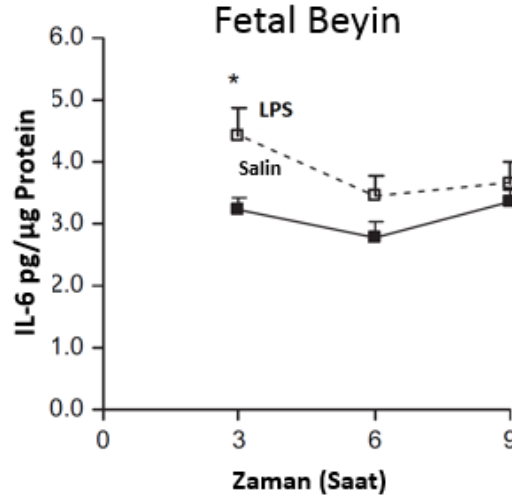
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ salin uygulanan grupla karşılaştırıldığında.

Prenatal periyoddaki maternal sağlık, yavruların immuno-kompenentinin saptanmasında kritiktir (27). Hodly, Williams ve ark. yaptıkları çalışmalarda prenatal LPS nin; Hodly in çalışmasında yavruların lenfosit ve monosit sayısında düşüşe sebep olduğu saptamıştır, Williams ve ark. çalışmasında ise yavruların doğuştan immun sisteminin baskılandığını, fetüsde troktoderm (plesenta) normalden küçük olduğunu saptamıştır (28, 82).

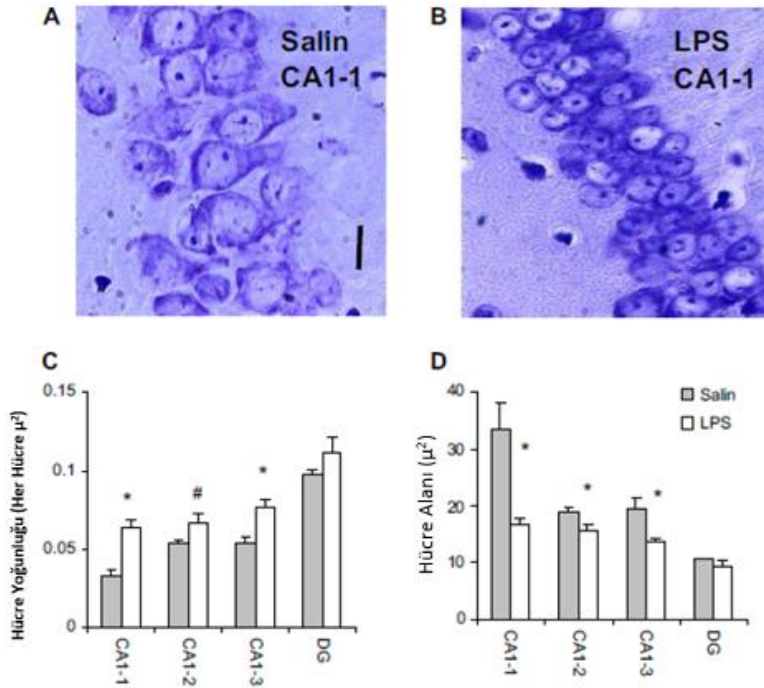
İntrauterin enflamasyon yavrularda mental yetersizlik ve nörolojik bozukluklarla sonuçlanabilir (29). İntrauterin enflamasyon nörogelişimsel beyin hasarı ve erken doğum için en büyük risk faktörüdür (30).

Maternal intrauterin enflamasyonlar proenflamatuar sitokin kaynaklı yavruların immatür beyinlerine etki ettiği düşünülüyor (31). Sitokinler maternal ve fetal ilişkili olarak plesentaya geçerek ve oradan fetüsün kan beyin bariyerine geçiş yapabildiği düşünülürse bu tez doğrulanmış oluyor (32). TNF- α , IL-B, IL-6 gibi proenflamatuar sitokinler neonatal beyin hasarı, neonatal enfeksiyonlar, erken doğum, intra-uterin enfeksiyonlara sebep olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (31, 32).

Golan ve ark. çalışmasına göre prenatal LPS maruziyeti postnatal yavrunun beyinde fetal sitokin olan IL-6 seviyesini ve hafıza ile öğrenmede bozulmayı, artırdığını saptamıştır (31).



Şekil 2.8. Prenatal LPS nin Fetal Beyinde IL-6 Seviyesi Üzerine Etkisi (31).

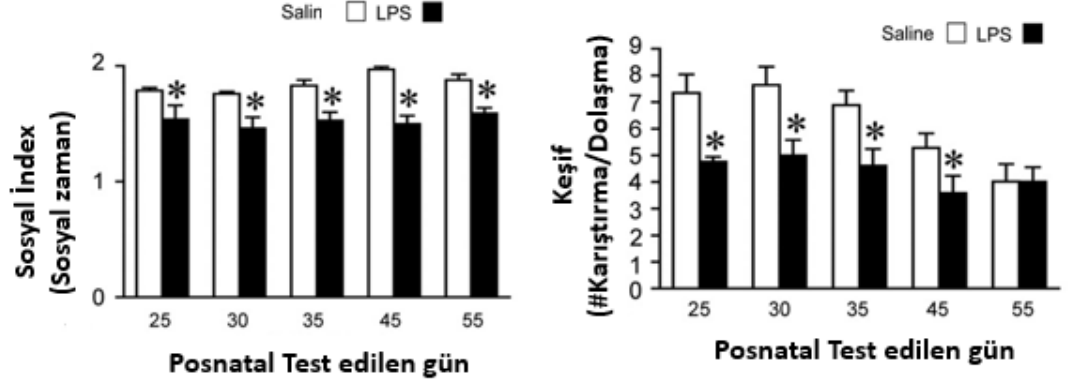


Şekil 2.9. Maternal LPS nin Hipokampüsteki Hücre Sayısına Etkisi (31).

Oskvig ve ark. benzer çalışmasında prenatal LPS maruziyeti fetal beyinde TNF- α , IL-1B, IL-6 gibi sitokinlerin düzeyinde artış, düzensiz gen yazılımı ve gen yazılımında azalma, sosyal olarak yavruların keşif, araştırma, dürtü ve sosyalleşmede azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (22). Bunların yanısıra maternal enfeksiyonlar ister viral ister

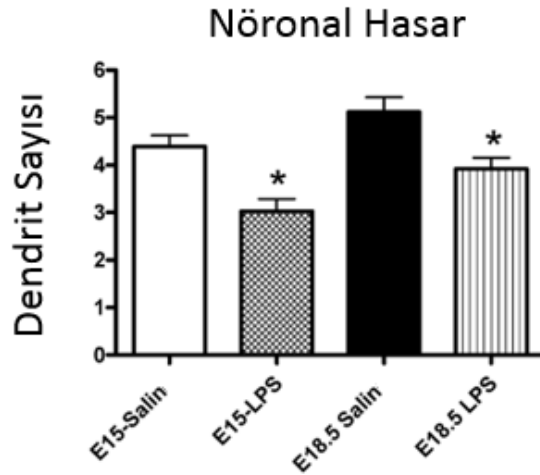
bakteriyel orjinli olsun yavruların sonraki gelişim evrelerinde otizm, şizofreni gibi psikiyatrik bozuklukların ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir (33, 34).

Prenatal 15. günde LPS yapılan annelerden doğan yavrular



Şekil 2.10. Maternal LPS nin Postnatal Sosyal ve Araştırma Davranışları Üzerine Etkisi (22).

Prenatal enflamasyon maruziyeti serabral palsi, şizofreni, otizm gibi uzun süreli nörodavranışsal bozukluklar için risk faktörü olduğu bilinmektedir (33). Bu tezin üzerine Elovitz ve ark. yaptığı çalışmada prenatal LPS maruziyeti fetal dentrik sayısını azaltırken beyin ve nöronal hasarı artırmaktadır (35).

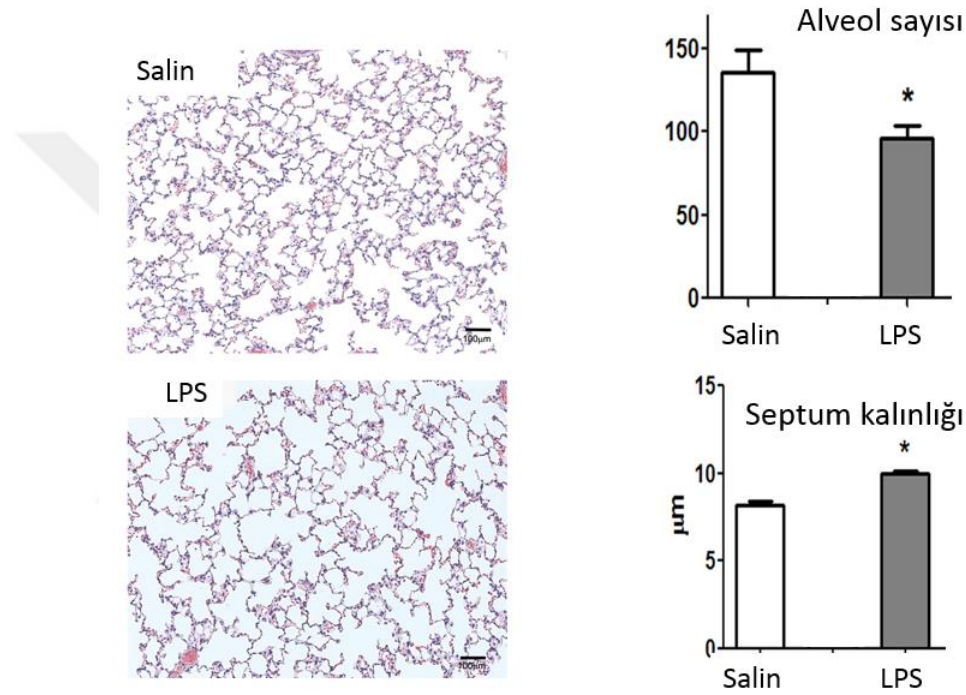


Şekil 2.11 Prenatal LPS nin Fetal Dentrik Sayısı Üzerine Etkisi (35).

Enayati ve ark. ise benzer uygulama ile LPS nin dozuna bağlı olarak kortikosteron seviyesinin arttığını, hayvanların depresyon ve anksiyete benzeri davranışlar gösterdiğini,

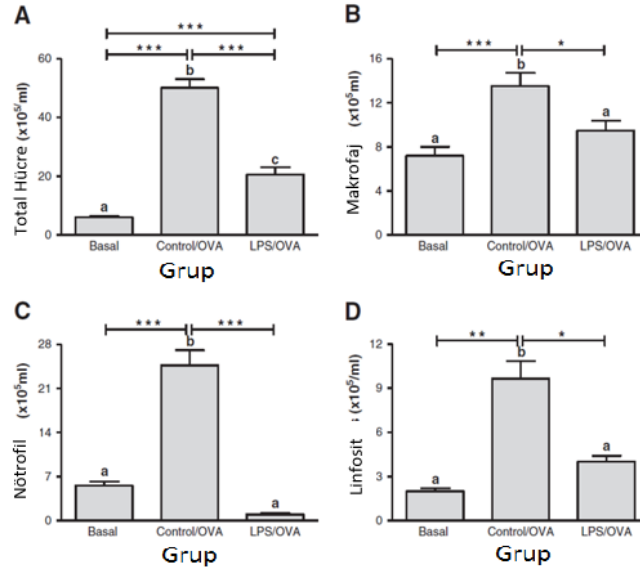
nöropsikiyatrik davranışlarda artış olduğunu bulmuştur (36). Lowe ve ark. ise şizofreni görülme riski ve nörogelişimsel bozulmalar saptamıştır (37).

İntra-uterin dönemde yaşanan sıkıntılar doğmadan önce akciğer oluşumunu tamamlayan yavruda hiç şüphesiz hava yolunda birtakım değişikliklere yol açacaktır (38). Velten ve ark. yaptığı çalışmada prenatal LPS maruziyeti neonatal üzerinde alveol sayısında azalışa, septal kalınlıkta artışa, bozulmuş alverazasyona ve akciğer fonksiyonunda bozulmaya sebep olmuştur.(39)



Şekil 2.12. Prenatal LPS nin Yavrunun Solunumu Üzerine Etkisi (39)

Kristen ve ark. göre hayatın erken evresinde karşılaşılan LPS maruziyeti akciğerlerdeki alerjik enflamasyonları azalttığı saptanmıştır (40). Kristen ve ark. maternal LPS nin postnatal yavru üzerine olumlu etkisini saptamış ve yaptığı çalışmaya göre gebeliğin erken evrelerinde uygulanan LPS astım kaynaklı cevabı azalttığını bulmuştur (40).

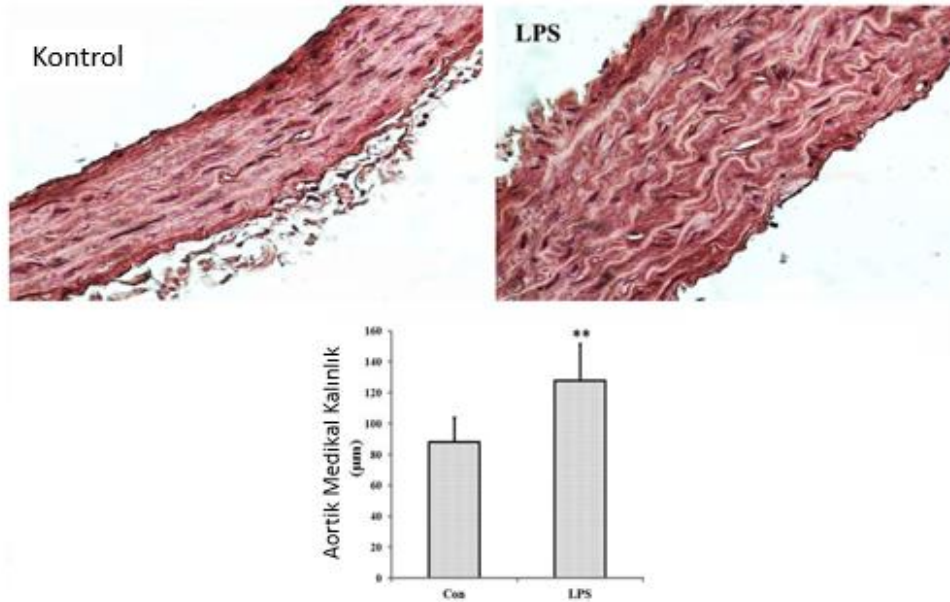


Maternal dönemde verilen LPS, doğduktan sonra ovalbumin ile oluşturulan immün stresi azaltmıştır

Dolayısıyla prenatal LPS deneysel astım modelinde faydalı bulunmuştur

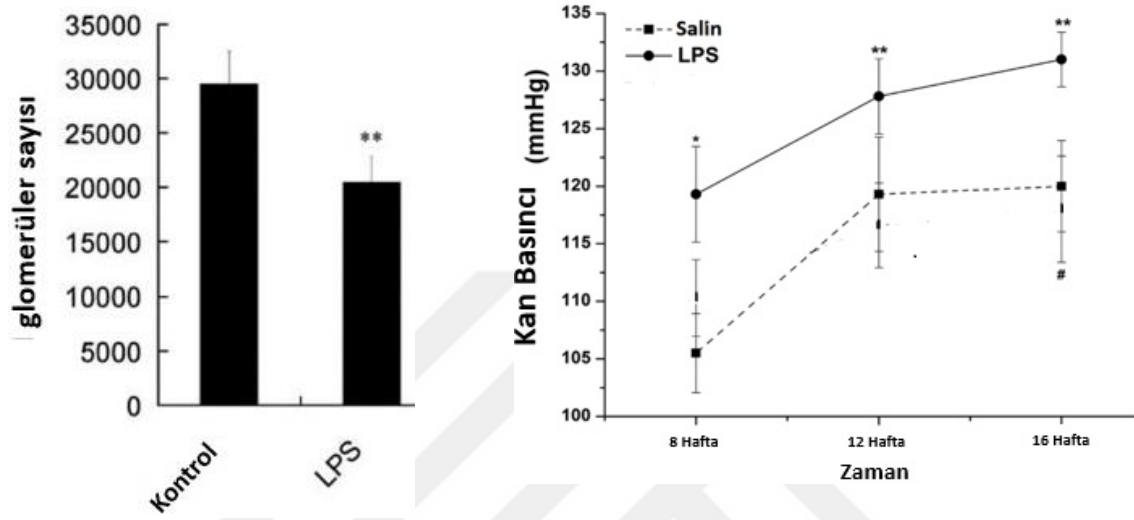
Şekil 2.13. Prenatal LPS nin Solunum Sistemindeki Alerjenlere Karşı Postnatal Etkisi (40).

Prenatal LPS maruziyeti yetişkin yavrularda hipertansiyonun oluşmasına yol açmaktadır (41). Zhao ve ark. yaptığı çalışmaya göre prenatal LPS maruziyeti yavrularda bozulmuş aortik reaktiviteye ve aorta yapısal anomalilere sebep olduğu bulunmuştur (42).



Şekil 2.14. Prenatal LPS nin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Postnatal Etkisi (42).

Prenatal LPS maruziyeti yavrudaki böbrek üzerine postnatal etkisini inceleyen çalışmaların bulgularına göre renal anjiyotensin II seviyesinde düşüş, glomerüler sayısında ve kreatin klirensinde azalma, fakat monosit ve lenfosit renal infiltrasyonunda artma, renal gelişimi etkilenmekte, kan basıncında ve adipose katsayısında artma gözlenmiştir (43, 44, 45).

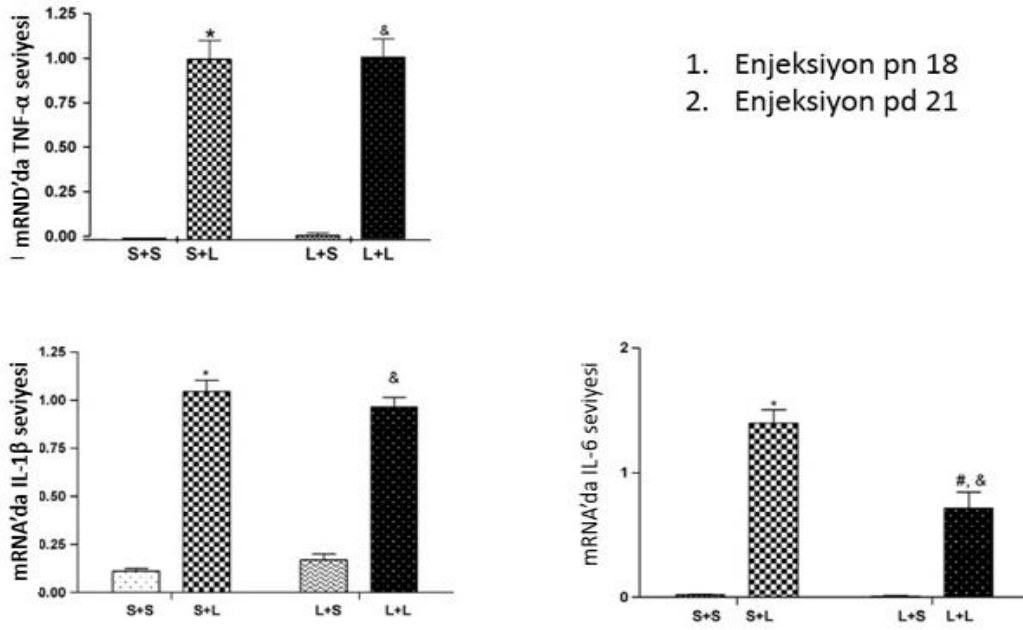


Şekil 2.15. Prenatal LPS nin Glomerus ve Kan Basıncı Üzerine Postnatal Etkisi (43, 45).

2.1.2.1. Tekrarlanan LPS

Birçok epidemiyolojik çalışma maternal enfeksiyonun fetüsün sağlığı üzerine çeşitli ve ciddi sorunlar ortaya çıkardığını göstermiştir (46). Spontan düşükler, erken doğumlar, intra-uterin büyüme gerilikleri, intra-uterin fetal ölümler yavruda ki gelişimsel anomaliler ve yukarıda bahsi geçen değişiklikler bunların başlıcalarıdır (46, 25).

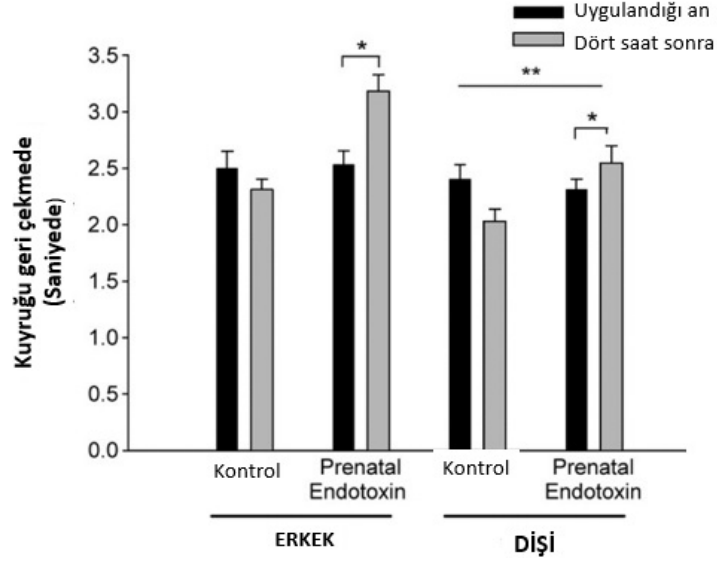
Deneysel hayvan modellerinde maternal LPS uygulamaları yalnızca intra-uterin fetal ölüm veya intra-uterin büyüme gerilikleri değil aynı zamanda yavruların immun fonksiyonunu önemli bir şekilde etkilemektedir (47, 48) Bununla birlikte bu çalışmalar maternal immun aktivasyonun yavrular üzerine uzun dönemli etkilerinin de olduğunu göstermiştir (48). Gebelik döneminde LPS maruziyeti çoğunlukla yavruya zarar veriyormuş gibi görünse de doğumdan sonra yavruya tekrarlanan LPS dozunun yararlı olduğuna dair çalışmalar da söz konusudur. Bu programlamaya dair az ve sınırlı sayıda çalışma olup tekrarlanan LPS dozunun yavrular üzerinde olumlu ve olumsuz etkileri söz konusudur (49, 50).



Şekil 2.16. Prenatal ve Postnatal LPS nin mRNA Sitokin Düzeyleri Üzerine Etkisi (48).

Lasala ve ark. yaptığı çalışmaya göre prenatal 18. günde uygulanan LPS'nin postnatal yavru üzerine 21. gün tekrarı ile diğer çalışmaların aksine LPS uygulanan yavruların serum TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri azalmış ve beyinde mRNA sitokin seviyesi buna kemokinler de dahil baskılanmıştır (50). Lasala ve ark. çalışmasının sonucuna göre maternal enfeksiyon yavruların LPS ye enflamatuar yanıtını baskılamıştır. Yavrular doğduktan sonra tekrarlanan LPS doz, enflamatuar yanıtı azaltarak endotoksik şoku veya yavrularda bakteriyel enfeksiyona karşı baskılanan immun cevabı önlemiştir ve bu açıdan yararlı bulunmuştur (50).

Hodyl ve ark. ağrı cevabını incelediği programlamada benzer çalışması ile prenatal LPS sonrası yetişkin yavrulara tekrarlanan LPS enjeksiyonu sonucu, LPS uygulanan grup kontrol grubuna göre ağrı eşiği daha yüksek bulunmuştur (51).



Şekil 2.17. Prenatal ve Postnatal LPS nin Ağrıya Yanıt Olarak Kuyruk Çekme Süresi (51).

Gerhold ve ark. ise alerjik hastalıkların prenatal dönem ve sonraki dönemde bakterial LPS gibi komponentlerle karşılaşması sonucu alerjik hastalıklardan korunulabileceğini savunmuştur (52, 49). Yavrularda meydana gelen hava yollarındaki enflamasyon ve alerjen kaynaklı hassasiyet için prenatal LPS'nin etkilerini incelemiştir (49). Sonuç olarak alerjen hassasiyetini arttıran *IgE* üretimini, eozonofilik havayolu iltihabını, havayolunu aktifleyen methacholine baskılamıştır, alerjen hassasiyetini önlemiştir (49). Bu etkiler sadece prenatal LPS maruziyetine kombine postnatal LPS ile oluşmuştur. Böylece alerjik rahatsızlıklara karşı korunmak için immun düzenleyici bir model olarak kullanılabilir.

2.2. Interleukin-1 Beta (IL-1B)

IL-1B interlökin1 ailesine ait etkili bir proenflamatuar sitokindir (53). Aynı zamanda IL-1B hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, ölümünü de içeren çeşitli hücresel aktiviteye sahip olduğu bilinir (54). IL-1 β çok sayıda otoimmün hastalıkların ilerlemesini kolaylaştırır. IL-1 β 'nin sebep olduğu tartışılan birçok hastalık bulunmaktadır, bunlar; romatizmal hastalıklar, uveit (göz damarı iltihabı), otoimmün tiroid hastalıkları, Diabetes Mellitus, otoimmün iç kulak hastalıkları, multiple skleroz, miyokardit, hepatit ve böbrek hastalıklarıdır (86). IL-1 β bir dizi enflamatuar ve immunomodulotör aktivitede bulunmaktadır. IL-1 β öncelikle monosit ve makrofajlar tarafından üretilir, aynı zamanda T hücrelerinde, NK hücrelerinde, endotelial hücre, fibroblast, astrosit, mikroglial hücreler,

adrenal kortikal hücreler ve pankreasın B hücreleri tarafından üretilir (55). IL-1 β mikrobial istila, enflamasyon, immun düzenleme, metabolik reaksiyon, hematopoietik süreç ve tümör gelişiminde konak cevap içeren pleiyotropik bir sitokindir. IL-1 β , DNA içeriğinin azalmasına, protein sinerjisi ve ve intraselüler enerji üretiminin düşmesini, B hücre apoptozis ve nekrozisini içererek önemli hücresel fonksiyonları etkiler (55,56).

2.3. Tümör nekroz faktör-Alfa (TNF- α)

TNF- α birden fazla etkiye sahip pleiyotropik enflamatuar bir sitokindir (57). Birçok organın, TNF- α tarafından etkilendiği ortaya konulmuş ve çeşitli fonksiyonlarda görev almaktadır (57). TNF- α hücrelerin çeşitli tipleri tarafından üretilir, özellikle makrofajlar tarafından üretilmektedir. TNF- α 'nın patojen özelliği olduğu kadar yararlı fonksiyonları da vardır (58). Örneğin düşük seviyede TNF- α nın bedendeki sirkadiyen ritmi düzenlenmesi sayesinde homeostazinin devam etmesine yardımcı olabildiği, dahası yine düşük seviyede TNF- α nın yeniden modelleme ve hasarlanmış ya da yaşlanmış dokuları yerine koyma özelliği vardır (57). İlaveten TNF- α bakteriyel, fungal, viral ve parazitik istilaya karşı immun cevap rolü vardır ve spesifik tümör nekrozunda rol alır (58, 59). TNF- α immun cevapta lokal enflamatuar rol oynayan anahtar bir mediatördür. TNF- α , makrofajlar ve nötrofillerin enfeksiyon alanına girmesi yoluyla vasküler geçirgenliği artırıp, sitokinlerin işlev aşamalarını başlatan akut faz bir proteindir (59, 33).

TNF- α 'nın patolojik aktiveteleri oldukça ilgi çekicidir. Örneğin TNF- α da tümörün bazı çeşitleri nekroza neden olur. TNF- α tümör hücrelerinin bazı çeşitlerinin ise büyümesine yol açar (60). Yüksek seviye TNF- α mortalite riskini artırır. Bakteriler, virüsler ve parazitlerin içsel ve dışsal faktörleri TNF- α ve diğer sitokinlerin üretimini uyarır (58, 33). Lipopolisakkarit özellikle TNF- α sinerjisi için olası uyarandır. TNF- α 'nın uzun süreli fazla üretimi sonucu karsinom, kronik enfeksiyonlar, septik şok, anorexia, anemiler, AIDS gibi daha birçok hastalığa yol açar (57, 61).

2.4. Kortikosteron

Bireylerin davranışsal ve fizyolojik özellikleri, yaşamlarının erken evrelerindeki olaylar tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir (62). Çevresel manipülasyonları ve strese cevabı kapsayan en büyük sistem hipotalamus- *hipofiz- adrenal aks (HPA)* dır (62). Stres fiziksel ve psikolojik olarak homeostaziye etkileyerek HPA nın uyarılmasına sebep olur. Stres verici bir uyarandan sonra *kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH)* ve *vazopressin (VP)* gibi nöropeptidler, hipotalamusun paraventriküler nükleusunun

parvosellüler nöronunda serbestlenir (63). Bu peptitler *adrenokortikotropik hormonu (ACTH)* sekrete ederek anterior hipofizi uyarırlar. ACTH da adrenal bezlerin aktivitesini başlatarak kortikosteron gibi glukokortikoid hormonları üretirler (64, 63).

Glukokortikoid hormonlar insanlarda kortizol hormonu, kemirgenlerde ise kortikosteron hormonu olarak ortaya çıkar (65). Bu hormonlar yukarıda da anlatıldığı üzere HPA sisteminin aktivasyonunda son adım olarak sunulurlar ve prenatal çevreden kaynaklı etkilerde en önemli rolü oynarlar (62).

Normal seviyedeki kortikosteron organizma için yararlı olsada, kortikosteronun normalden fazlalığı ya da yoksunluğu organizmanın sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir (64).

Annelere uygulanan farklı stresörler, örneğin elektrik şok, anestezi veya jugular ven delinmesi gibi işlemler HPA aksi aktivasyonunu uyararak plasma kortikosteron seviyesini artırmıştır (65). Dişi ve erkek sıçan yavrularında erişkin dönemde strese yanıt yüksek kortikosteron ve öğrenme güçlüğü ile kendini göstermiştir (66). Yeni doğan sıçanlarda uzun süreli (24 saat) maternal yoksunluk sonucu bazal HPA aksinin aktivasyonu yükselmiş ve erkek rat yavrularının ileriki döneminde hipokampal alandaki kortikosteron seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (62). Schoenfeld ve Gould'un yaptığı çalışmada kortikosteronun ekzojen olarak uygulanması sonucu, kemirgenlerde çoğalan hücrelerin sayısında ve yeni granül nöronların hayatta kalımında azalma görülmüştür (66).

2.5. Oksidatif Stres

Serbest radikaller atomik orbitalde eşlenmemiş elektronları içeren bağımsız oluşumların moleküler türleri olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller bütün hücrelerin fonksiyonu olarak devam eder (67). Buna karşın aşırı serbest radikal üretimi endojen ve ekzojen kaynaklı birçok hastalığa sebep olup, önemli hücre ve doku hasarına sebep olmaktadır (68).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre birçok temel hücresel reaksiyonda vucutta serbest radikallerin anahtar rol oynadığına dair kanıtlar bulunmuştur ve oksidatif stresin ateroskleroz, diyabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği gibi diğer kronik hastalıkları içeren patofizyolojik yaygın hastalıklara sebep olduğu iddia edilmiştir (69). Serbest radikallerin çoğalması oksidatif stresi beraberinde getirir. Diğer bir değişle serbest radikallerin üretimi antioksidan savunma kapasitesini aştığında oksidatif stres oluşur

(70). Hücreler hafif düzeyde oksidatif stresi idare etseler bile sıklıkla antioksidan sistem ile birlikte mücadele ederler. Antioksidan sistem, antioksidan maddeler ile hücreye zarar veren serbest radikallerin eşleşmemiş elektronları baskılayarak ya da yok ederek hücreyi yıpranmaya karşı koruma görevindedir (71). Hücre içi savunma sistemi yetersiz olduğunda reaktif oksijen türleri ile antioksidan arasındaki ilişki bozulur ve oksidan hasara duyarlı protein, karbonhidratlar, lipidler ve DNA gibi hücresel makromoleküller hasar görür (72). Bundan dolayı oksidatif stresin varlığı, antioksidan özellik gösteren *süperoksit dismutaz (SOD)*, *glutasyon (GSH)* ve *katalazı (CAT)* azaltırken, lipid peroksidasyonunu en önemli göstergelerinden olan *molonildialdehid (MDA)* düzeyini artırır (73).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafınca başlatılıp zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olan kimyasal bir olgudur (73, 74). Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere çevrilmesi ile sonlandırılmaktadır. Bunlar *molonildialdehid (MDA)*, *4 hidroksinoneal*, *pentan*, *etan*, alkoller ve benzeri ürünlerdir (74). Oksidatif stres parametrelerinden biri MDA lipid peroksidasyonun göstergesi olarak bilinir. Diğer bir parametre ise Süperoksit dismutaz (SOD) dır. SOD enzimi süperoksit radikalının, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevrilmesini sağlayarak hücre içindeki radikal seviyesini azaltır. SOD organizmalarda bir antioksidan olarak hizmet eder (70, 71). Diğer antioksidan özellik taşıyan katalaz hücre içinde bulunan peroksizomda büyük bir yer kaplarken bu peroksizomlar hidrojen peroksit üretebilen enzimlerin çoğunu içerir. Hidrojen peroksit katalaz sayesinde su ve osijene çevrilerek zararsız hale getirilir (75). Diğer parametre *glutasyon (GSH)*, serbest radikallere karşı savunma mekanizmasının önemli bileşenlerindedir. Aynı zamanda glutasyon peroksidazın önemli aktifleyicisidir (69). Konsantrasyonu hücresel salıverilme hızı ile oksidatif stres düzeyi ile bilgi edinilir (69, 76).

Tablo 2.2. Prenatal Lipopolisakkarit, Postnatal Anne ve Yavru Üzerine Etkileri (15, 20, 21, 22, 26, 28, 31, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 82).

Yazar yılı	Tür	Günü		Dozu /Yolu		Cinsiyet		Gözlenen Bulgular
		Prenatal	Postnatal	Prenatal	Postnatal	Anne	Yavru	
Enayati ve ark. (2012)	Fare	15,16, 17	-	50,300, 500 µg/kg ip	-	♀	♂	Maternal: Doz miktarı artıkça IL-1B↑, TNF-a↑,IL-6↑, kortikostreon↑ Yavru : Doz miktarı artıkça kortikostreon ↑, immobility↑, Depresyon ve anksiyete benzeri davranış↑, nöropsikiyatrik davranışlar↑
Elavitz ve ark. (2011)	Fare	15,18 emriyo	-	50 µg/kg ip	-	♀	♀♂	Maternal: Erken doğum ↑, Yavru: fetal dentrik sayısı↓, beyin hasarı ↑, nöronal hasar ↑, intrauterin enflamasyon ↑ sonucu gen ekspresyonunda değişim↑
Golan ve ark. (2005)	Fare	17.	-	0.12 mg/kg ip	-	♀	♀♂	Beinde maternal, fetal sitokin IL-6↑, hipokampüste granual hücre↑, piramidial sayı ↑, piramidial hücrelerde çekilme↑, hafıza ve öğrenmede bozulma↑
Surriga ve ark. (2009)	Sıçan	18.	21	500 µg/kg ip	250 µg/kg ip	♀		Maternal immun aktivasyon↓, Yavru: IL-6 mRNA ekspresyon↓,karaciğer enzimlerine çeşitli etki↑
Zhao ve ark. (2014)	Sıçan	8,10,12		0.79 mg/kg ip	-	♀	♀♂	Bozulmuş aortik reaktivite↑, aorta yapısal anomalikler, aortada protein mRNA ekspresyonu↓, NF-KB seviyesi↑
Williams ve ark (2011)	Fare	0.5 (zygote strage)	-	10,50, 150 µg/kg ip	-	♀	♀♂	Maternal: proinflamatuvar sitokin (IL-1B, TNF-a, IL-12, MCP-1) ↑, yiyecek tüketimi ↓, beden ağırlığında↓, kortikosteron↑ Yavru: Doğuştan immun sistemi baskılanma↑, anormal davranışlar↑, yağlanma↑, Fetüs: trofektoderm(plesanta) (1cm) ↓, hücre oranı↓
Hodyl ve ark. (2007)	Sıçan	16,18, 20	19,50,100 ,400	200 µg/kg sc	50, 100 µg/kg sc	♀	♀♂	Maternal kortikosteron ↑, Fetal kortikosteron ↑, ağırlık↓ Yavruların puperte IL-1↑, lenfosit↓, monosit↓
Lasala ve ark. (2007)	Sıçan	18	21	500 µg/kg ip	250 µg/kg ip	♀	♀♂	Yavruda kemokinler ↓, MIP-1B↓, MIP-2↓(makrofaj enflamatuvar protein), beyinde mRNA düzeyinde TNF-a, IL-1B, IL-6↓, KC(keratirocyte derived chemokine) ↓,serumda TNF-a, IL-1B, IL-6↓, Maternal enfeksiyon yavruların LPS ye enflamatuvar yanıtını baskılamıştır.

French ve ark. (2013)	Hamster	11.	-	0.07/0.7 mg/kg ip	-	♀	♀♂	Maternal: gebelik başarımı↓, başarılı üremenin göstergesi olan batın büyüklüğü↓, iştahsızlık↑ Yavru: kortizol↑, ısırma saldırganlık↑, savuma davranışları↑
Solati ve ark. (2012)	Fare	10.	-	1,5,10 µg/kg ip	-	♀	♂	Maternal: Tnf-a↑, IL-1B↑, IL-6↑ Yavru: LH↓, Testosterone↓
Bernardi ve ark (2010)	Sıçan	21.	-	250 µg/kg ip	-	♀	♂	Maternal: anneliğe dair davranışlarda↓, genel aktivitede↓, beden ağırlığında↓, perinatal anne ölümleri↑, prenatalde beden ağırlığında↓ Yavru: beden ağırlığı↓, Anogenital aralık ve gününe göre inmiş testis uygun olmama↑, sexual davranışlarda bozulma↑, ejakülasyon↓, testis ağırlığı↓
Wang ve ark. (2014)	Fare	13,17	-	50 µg/kg ip	-	♀	♀♂	Maternal kilo↓, Yavru: Kilo↓, Testiküler gelişim ve sperogezde bozulma↑, leyding cell cluster↓ serum T↓, LH ↔, sperm sayısı↓, anogenital uzaklık erkeklerde↑, dişi↔
Oskvig ve ark. (2012)	Sıçan	15	-	0.25mg/kg ip	-	♀	♀♂	Maternal: serum ve amniyotik sıvıda tnf-a↑, IL-1B↑, IL-6↑ Yavru: fetal beyinde tnf-a↑, IL-1B↑, IL-6↑, düzensiz gen yazılımı↑, gen yazılımında↓, keşif araştırma dürtü↓, sosyolleşme↓
Lowe ve ark. (2008)	Sıçan	15,16	-	100 µg/kg ip	-	♀	♂	Presinaptik impulslarda↓, eksitör postsinaptik potansiyel↓, sinir uyarımı↓, şizofreni risk↑, piramidal hücre uyarımı↓, glutenerjik cevap↓, nörogelişimde bozulma↑, hipokampal sinaptik geçişi etkileme↑
Hodyl ve ark. (2010)	Sıçan	16,18, 20	90	200 µg/kg ip	100 µg/kg ip	♀	♀♂	Ağrı eşiği↑
Velten ve ark (2012)	Fare	16(E)	-	80 µg/kg ip	-	♀	♀♂	Alveol sayısı↓, septal kalınlık↑, pulmonerdeki statik komplians bozulma↑, bozulmuş alverzasyon↑, Akciğer fonksiyonu↓
Gerhold ve ark. (2006)	Fare	1 den 14. güne kadar	1 den 25.güne kadar	1 µg/kg aerosol	1 µg/kg aerosol	♀	♀♂	Ig E (alerjik ajan) ↓, eozonofilik havayolu enflamasyonu↓, havayolunu reaktifleyen methacholine ↓, allerjen hassasiyeti TH2 immün cevabı inhibe ederek önlemiştir.
Kristen ve ark. (2011)	Sıçan	9.5	-	100 µg/kg ip	-	♀	♀	Astım kaynaklı cevap ↓, akciğerlerdeki periferel kanda immün gücünü ↓

Hao ve ark. (2013)	Sıçan	8,10,12	-	0.79 mg/kg ip	-	♀	♀♂	Embroyada AT2-R mRNA ekspresyonu ↓, TNF-a, IL-6 mRNA ekspresyonu ↑, renal anjiyotensin II seviyesi ↓, glomeruler sayısı ↓, kreatin kliransı ↓, renal infiltrasyonda monosit ↑, lenfosit ↑ Emriyoda AT2-R değişimi ve enflamatuvar sitokin gen ekspresyonu yaparak renal gelişimi etkilemektedir.
Goa ve ark (2014)	Sıçan	8,10,12	-	0.79 mg/kg ip	-	♀	♀♂	Yavrularda; kan basıncı ↑, adipose katsayısı ↑ ve beden ağırlık ↑ Adipose hücrelerinin çapında ve kapladığı alan ↑, adipose dokudaki anjiyotensin II ekspresyonu ↑, ACE ilişkili ekspresyonu ↑, AT 1 ekspresyonu ↑.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alınıp, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNU-DEHUM)'de uygulanmıştır.

3.2. Deney Hayvanları

Bu araştırma İNU-DEHUM' inde üretilen 6 aylık 10 adet Sprague-Dawley türü 200-250 gr anaç sıçandan elde edilen dişi yavrular üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar 22 ± 2 °C oda sıcaklığında, 12/12 (ışık/karanlık) olacak düzenekte, *ad libitum* olarak beslenmiştir. Gebeliği sağlamak için 2 dişi ile 1 erkek sıçan aynı kafese bırakılmış, ertesi gün 09:00-11:00 saatleri arasında vajinal smear alınarak spermatozid gözlenen preparatlar pozitif kabul edilmiş, gebeliğin 0. günü olarak kayıt edilmiş, tekli kafeslere alınmıştır. Prenatal 18. günde planlanan enjeksiyon uygulanmıştır. Doğumun gerçekleştiği gün kaydedilip, 21.gün dişi yavrular 4' erli olacak şekilde kafeslere ayrılmıştır. Yavrular 60. günde 9:00 civarında canlı ağırlıkları tartılarak planlanan enjeksiyon protokolü (aşağı bkz) uygulanmıştır ve 4 saat sonra anestezi altında kalpten kanatılarak kalp, karaciğer, böbrek dokuları alınarak tartılmıştır.

3.3. Deney Grubu

Planlanan araştırmaya uygun olarak, aşağıda belirtildiği gibi her grupta 8-9 erişkin sıçan olacak şekilde 4 deney grubu oluşturulmuştur.

Tablo 3.1. Deney Grup ve Sayıları

Anne sayısı Uyg. Enj. (ip)	Grup	Dişi yavru Sayısı	Prenatal 18. gün Uyg. Enj. (ip)	Yavru 60. gün Uyg. Enj. (ip)
5 (salin)	1. Grup	9	Salin	Salin
	2. Grup	9	Salin	LPS
5 (LPS)	3. Grup	8	LPS	Salin
	4. Grup	8	LPS	LPS

- 1. Grup, Salin +Salin;** Prenatal 18.günde 100 µg/ kg dozunda steril salin ip yolla enjekte edilmiştir. Bu anaçlardan elde edilen dişi yavrulara 60. günde 100 µg/ kg dozunda steril salin ip yolla enjekte edilmiştir.
- 2. Grup, Salin+LPS;** Prenatal 18.günde 100 µg/ kg dozunda steril salin ip yolla enjekte edilmiştir. Bu anaçlardan elde edilen dişi yavrulara 60. günde 50 µg/ kg dozunda LPS ip yolla enjekte edilmiştir.
- 3. Grup, LPS+ Salin;** Prenatal 18.günde 50 µg/ kg dozunda LPS ip yolla enjekte edilmiştir. Bu anaçlardan elde edilen dişi yavrulara 60. günde 100 µg/ kg dozunda steril salin ip yolla enjekte edilmiştir.
- 4. Grup, LPS+LPS;** Prenatal 18.günde 50 µg/ kg dozunda LPS ip yolla enjekte edilmiştir. Bu anaçlardan elde edilen dişi yavrulara 60. günde 50 µg/ kg dozunda LPS ip yolla enjekte edilmiştir.

3.4. Enjeksiyon Protokolü

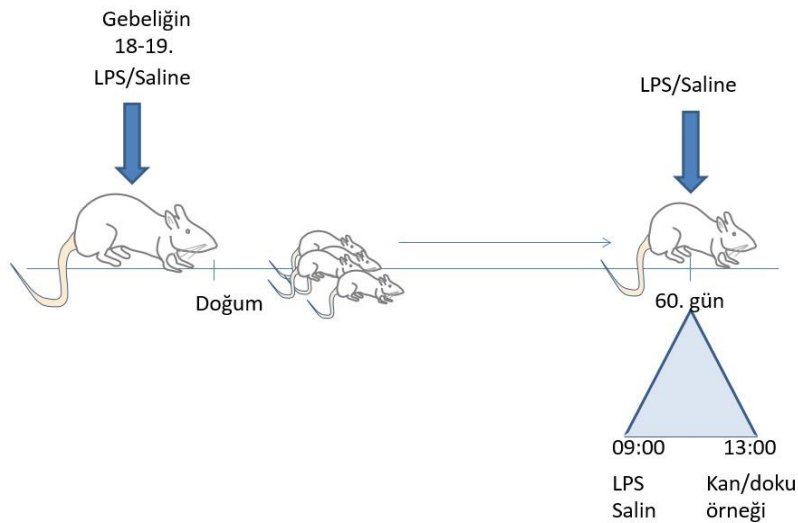
3.4.1. LPS Uygulanması

Lipopolisakkarit (LPS, *Escherichia coli* serotype 0111:B4, Sigma L-2630), 0.05 ml hacimde 50 µg/ kg dozunda olacak şekilde serum fizyolojik ile hazırlanıp, insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

3.4.2. Serum Fizyolojik Uygulanması

Steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) 100 µg/ kg miktar insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Deneysel uygulama şeması aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel uygulama şeması ile gebelik 18. gününde LPS/salin enjekte edilen annelerden doğan yavular, her grupta 8,9 sıçan yavrusu olacak şekilde toplam 4 grup oluşturulmuş, 60. günde saat 9:00 da yapılan enjeksiyondan 4 saat sonra kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Şekil 3.1. de deneysel uygulama aşaması gösterilmiştir. Prenatal 18.-19. günler arasında LPS/saline uygulanarak, bu sıçanlardan elde edilen dişi yavular erişkin döneme (60.gün) ulaştıklarında LPS/saline uygulandıktan 4 saat sonra kan ve organ örnekleri alınmıştır.

3.5. Serum TNF- α düzeylerinin Saptanması

Serum TNF- α düzeyleri rat TNF- α ELISA kiti (Booster, ABD) ile belirlendi. Kit kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Testte kullanılan solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Serum örnekleri: Serumlar -20 C'den alınarak oda ısısına getirildi.

Yıkama solüsyonu: Testin yıkama tamponu olarak 0,02 M PBS, 2 L deionize suda çözünerek kullanıldı (pH: 7.2-7.6). Wash buffer deiyonize su ile 25 kat sulandırılarak hazırlandı.

Biyotinli Antikor: 15 dakika içerisinde kullanılmak üzere biyotinli antikor, antikor dilüent solüsyonu ile 100 kat sulandırılarak hazırlandı.

Avidin-Biyotin Peroksidaz Kompleksi: Streptavidin peroksidaz enzimi, avidin biyotin kompleksi için dilüent solüsyonu ile 100 kat sulandırılarak hazırlandı.

Standart dilüsyonlarının hazırlanması (1-7): 2-7. standart tüpün her birine 300 μ l sample dilüent eklendi. Birinci standart tüpüne 900 μ l sample dilüent solüsyonu üzerine stok standart solüsyonundan (1000 pg/ml) 100 μ l eklendi ve bu tüpten diğer standart tüplerine sırasıyla 300 μ l aktarıldı. Her standart tüpü 10 dakika vorteks ile çalkalandırıldı. TNF- α yoğunluğu, birinci standarttan yedinci standarta kadar sırasıyla 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.1, 15.6 pg/ml oldu. Hazırlanan standartlar 60 dakika içerisinde kullanıldı.

Test protokolü aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.2. Serum TNF- α düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü

	BLANK	STANDART	SERUM
Standart dilüent solüsyonu	100 μ l	---	---
Std/ Numune	---	100 μ l	100 μ l
90 dakika 37 C’de inkübasyon			
Yıkama x 3			
Biyotin-Conjugate	---	100 μ l	100 μ l
60 dakika 37 C’de inkübasyon			
Yıkama x 4			
ABC	---	100 μ l	100 μ l
30 dakika 37 C’de inkübasyon			
Yıkama x 5			
TMB substrat	90 μ l	90 μ l	90 μ l
20 dakika 37 C’de ve karanlıkta inkübasyon			
Stop solüsyonu	100 μ l	100 μ l	100 μ l
450 nm okuma			

3.6. Serum IL-1 β Düzeylerinin Saptanması

Serum IL-1 beta, rat IL-1 beta ELISA kiti (Booster, ABD) ile belirlendi. Kit kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Testte kullanılan solüsyonlar kısaca aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Serum örnekleri: Serumlar -20 C’den alınarak oda ısısına getirildi.

Yıkama solüsyonu: Testin yıkama tamponu olarak 0,02 M PBS, 2 L deionize suda çözünerek kullanıldı (pH: 7.2-7.6). Wash buffer deiyonize su ile 25 kat sulandırılarak hazırlandı.

Biyotinli Antikor: 15 dakika içerisinde kullanılmak üzere biyotinli antikor, antikor dilüent solüsyonu ile 100 kat sulandırılarak hazırlandı.

Avidin-Biyotin Peroksidaz Kompleksi: Streptavidin peroksidaz enzimi, avidin biyotin kompleksi için dilüent solüsyonu ile 100 kat sulandırılarak hazırlandı.

Standart dilüsyonlarının hazırlanması (1-7): 2-7. standart tüpün her birine 300 μ l sample dilüent eklendi. Birinci standart tüpüne 800 μ l sample dilüent solüsyonu üzerine

stok standart solüsyonundan (2000 pg/ml) 200 µl eklendi ve bu tüpten diğer standart tüplerine sırasıyla 300 µl aktarıldı. Her standart tüpü 10 dakika vorteks ile çalkalandır. TNF-α yoğunluğu, birinci standarttan yedinci standarta kadar sırasıyla 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.1 pg/ml oldu. Hazırlanan standartlar 60 dakika içerisinde kullanıldı.

Test protokolü aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.3. Serum IL-1β Düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü

	BLANK	STANDART	SERUM
Standart dilüent solüsyonu	100 µl	---	---
Std/ Numune	---	100 µl	100 µl
90 dakika 37 C'de inkübasyon			
Yıkama x 3			
Biyotin-Conjugate	---	100 µl	100 µl
60 dakika 37 C'de inkübasyon			
Yıkama x 4			
ABC	---	100 µl	100 µl
30 dakika 37 C'de inkübasyon			
Yıkama x 5			
TMB substrat	90 µl	90 µl	90 µl
20 dakika 37 C'de ve karanlıkta inkübasyon			
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
450 nm okuma			

3.7. Serum Kortikosteron Düzeylerinin Saptanması

Serum kortikosteron düzeyleri ELISA yöntemiyle (Sun Red, Kortikosteron ELISA Kiti, Çin) belirlendi.

Testte kullanılan kimyasal ajanlar ve hazırlanmaları:

Assay buffer 15: 90 ml deiyonize suya Assay buffer konsantre solüsyondan 10 ml eklenerek hazırlandı.

Yıkama solüsyonu: 95 ml deiyonize suya Konsantre solüsyondan 5 ml eklenerek hazırlandı.

Standartların hazırlanması (1-5): Tüm tüplere 120 µl standart dilüent solüsyonu eklendi. 1. tüpe 120 µl stok kortikosteron eklendi. Birinci tüpten beşinci tüpe kadar aşağıdaki şekilde sırasıyla 640, 320, 160, 80, 40 ng/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan standartlar 60 dakika içerisinde kullanıldı.

Test protokolü aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.4. Serum Kortikosteron Düzeylerinin Saptanmasında Test Protokolü

	BLANK	STANDART	SERUM
Std/ Numune	---	50 µl	40 µl
HRP-Conjugate	---	50 µl	50 µl
Antikor		---	10 µl
60 dakika 37 C'de inkübasyon			
Yıkama x 5			
Kromojen A ve B	50 µl	50 µl	50 µl
10 dakika 37 C'de ve karanlıkta inkübasyon			
Stop solüsyonu	50 µl	50 µl	50 µl
450 nm okuma			

3.8. Karaciğer, Böbrek, Kalp Dokularının Analizlere Hazırlanması

Deneylerin yapılacağı gün derin dondurucudan çıkarılan dokular (+4 C°) bekletilerek buzlarının çözülmesi sağlandı ve sonrasında tartılarak her bir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. Homojenizasyon öncesi doku örnekleri, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktararak soğukluğu muhafaza edildi. Dokuların üzerine soğuk 2 mL Tris-HCl tamponu (pH 7,4, 0.2 mM) eklenerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 1 mL daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200xg'de +6 C° soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar SOD, GSH ve protein tayinlerinde kullanıldı.

3.9. Karaciğer, Böbrek, Kalp Dokularında Yapılan Analizler

3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler: Substrat solüsyonu [0,3 mmol/L ksantin, 0,6 mmol/L. Na₂EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L sığır serum albümini (BSA)], ksantin oksidaz (XO:167 Ü/L), 2M (NH₄)₂SO₄, 0,8 mmol/L CuCl₂.

Deneyin prensibi: Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve ark. tarafından tanımlanan, Durak ve ark. tarafından modifiye edilen NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı (79,80). Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilmektedir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_K - A_N) / A_K \times 100$$

A_K: Kör absorbanansı

A_N: Numune absorbanansı

%50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

$$\text{Aktivite (Ü/mL)} = [(\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1 / 0.1)] \text{ mL}$$

Spesifik aktivite (Ü/mg protein) = [Ü/mL/mg/mL protein]. Sonuçlar, Ü/mg protein olarak ifade edildi.

Deneyin yapılışı: Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 1 saat süreyle 2200xg' de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

Tablo 3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini Test Protokolü

	Kör	Numune
Substrat solüsyonu	2.85 mL	2.85 mL
Kloroform-Etanol Ekstraktı	-	0.100 mL
Bidistile su	0.100 mL	-
XO (167 Ü/l)	0.050 mL	0.050 mL
25 C°'de 20 dakika inkübasyon süresi başlatıldı.		
CuCl ₂	1 mL	1 mL

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu.

3.9.2. Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Kullanılan reaktifler: % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, %10 triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ve 20 mM/L 1,1,3,3- tetrametoksipropan (standart).

Prensibi: Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı (81). En çok kullanılan lipit peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiyoarbitürik asit ile 90-95 C° de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 3.6. Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini Test Protokolü

	Numune	Kör
Homojenat	0.5 ml	-
TCA %10	2.5 ml	2.5 ml
Deiyonize su	-	0.5 ml

90 C° 15 dakika bekletildikten sonra 3000×g 'de 10 dakika santrifüj

Süpernatant	2 ml	2 ml
TBA %675	1 ml	1 ml

90 C° 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm 'de okunur.

Hesaplama: 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile

standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

3.9.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini

Kullanılan reaktifler: Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanarak absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H₂O₂ çözeltisi.

Deneyin prensibi: Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (82). 240 nm'de maksimum absorbans veren H₂O₂ deney ortamına ilave edilen katalaz aktivitesiyle su ve oksijene parçalanır. Bu durum uv spektrumunda absorbans azalmasına neden olup absorbanstaki azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Bir CAT ünitesi: Birim zamanda bir mikromol H₂O₂'i suya çeviren enzim miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Kör olarak fosfat tamponunun kullanıldığı uv spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra H₂O₂ çözeltisi 0.500 absorbans verecek şekilde aynı tampon ile dilüe edildi ve substrat olarak kullanıldı. Substrat içine numune ilavesiyle her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile absorbans azalması kaydedildi. Hesaplamada 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri esas alındı.

Tablo 3.7. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini Test Protokolü

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)	3 mL	-
H ₂ O ₂ çözeltisi (A ₂₄₀ =0.500)	-	2.99 mL
Süpernatant	-	0.01 mL

Hesaplama: $k = [2.3 \times \log (OD_1/OD_2)] / \Delta t$ (sn)

$k/\text{gr protein} = k / [(g/\text{mL protein}) \times 1000]$

Sonuçlar, k/gr protein olarak hesaplandı. Burada k, reaksiyon hız sabitidir.

3.9.4. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini

Kullanılan reaktifler: A reaktifi: 20 mmol CuSO₄, 34 mmol Na₃Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na₂CO₃, 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

Deneyin prensibi: Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (83). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat

reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir: Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Deneyin yapılışı: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. "OD – mg/mL protein konsantrasyonu" grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

Tablo 3.8. Doku Homojenat ve Süpernatant Ekstraktlarında Protein Tayini Test Protokolü

	Numune	Kör
Numune	10 µL	-
Deiyonize su	490 µL	500 µL
C Reaktifi (5/1:B/A)	2.5 mL	2.5 mL
Karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.		
D Reaktifi (1/1:FCF/d.s.)	0.25 mL	0.25 mL

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm'de köre karşı OD okunur.

$$\text{Hesabı: Protein (mg/mL)} = (K_{st}/A_{st}) \times A_N$$

K_{st} : Standardın konsantrasyonu

A_{st} : Standardın absorpsiyonu

A_N : Numunenin absorpsiyonu

3.9.5. GSH Analizi

Kullanılan reaktifler: 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu)

Prensibi: GSH konsantrasyonu Beutler ve ark.¹¹⁶ metoduna göre ölçüldü. GSH seviyesi, 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu) ile sülfhidril gruplarının sarı renk oluşturması ve bu rengin 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. GSH seviyesi µmol/g protein olarak verildi.

3.10. Hematolojik Parametreler

Hematokrit analizi:

- Kan, yatay tutulan bir heparinize kılcal tüp ile hava kabarcığı girmeden $\frac{3}{4}$ oranında dolduruldu.
- Kapiller tüp bir ucundan cam macunuyla kapatıldı.
- Kapalı ucu dışa gelecek şekilde hematokrit santrifüj cihazına (Nuve- NF 048, Türkiye) yerleştirilerek 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüp, hematokrit skalasına yerleştirilerek % hematokrit değeri okundu.

Lökosit sayımı:

- Alınan kan Türk çözeltisi ile 10 kat sulandırılarak karıştırıldı (10 µl kan + 100 µl çözelti).
- Karışımdan pipetle bir kaç damla alındı ve Thoma lamı üzerine yerleştirilmiş lamelin altından sızdırıldı.
- Işık mikroskobu ile Thoma lamında bütün alanlarda bulunan lökositlerin toplamı alındı.
- Elde edilen sayı 100 ile çarpılarak mm^3 'teki lökosit miktarı hesaplandı.

Kan yayma preparatı (froti) yöntemi ile lökosit alt tiplerinin sayımı:

- Bir damla kan lamın kenarından 1 cm kadar mesafede bir noktaya damlatıldı.
- Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan bir lamel, kan damlasının ön kısmına gelecek şekilde kan damlasına doğru 45 derecelik bir açıyla temas ettirildi.
- Kanın lamelin iki köşesine yayılması için kısa bir süre beklendikten sonra lamel kaldırılmadan lamın diğer kenarına doğru seri bir şekilde sürüldü.
- Preparat 1 dakika havada kuruduktan sonra metil alkol ile fikse edildi ve tekrar kurutuldu.
- Preparat % 10'luk Giemsa boyası ile 15 dakika muamele edildi.
- Boyanın fazlası distile su ile yıkandıktan sonra lam dik tutularak kurutuldu.
- Yayma preparatı ışık mikroskobu altında 40X'lık objektifte incelendi.
- Lökosit alt tipleri lenfosit, monosit, nötrofil, eozonofil ve bazofil hücrelerinden toplam 100 tane sayıldı. Böylece lökosit hücrelerin yüzde oranı hesaplandı.

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm grupların parametrelerine ait verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics 22.0 programı kullanılmıştır. Veriler medyan (min-maks) veya ortalama (standart sapma) ile verildi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmalarında ise Conover testi ile kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Araştırmada incelenen canlı ve organ ağırlıkları, hematolojik parametreler, hormonal parametreler ve sitokinler, oksidatif stres parametreleri aşağıda tablolar ve grafiklerle sunulmuştur.

4.1. Canlı ve Organ Ağırlıklarının Değişimi

Aşağıda prenatal (18. gün) lipopolisakkarit (LPS) veya salin (SF) enjekte edilen sıçanlardan doğan yavrulara postnatal 60. günde LPS veya salin enjekte edilmesinin canlı ve organ ağırlıklarına üzerine etkisine ilişkin bulgular sunulmuştur.

Tablo 4.1. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Canlı Ağırlık (g) ve Organ Ağırlıkları (g) Üzerine Etkileri.

	SF+SF	SF+LPS	LPS+ SF	LPS+LPS	p
Canlı Ağırlık	159±14 ^a	165±9 ^a	150±7 ^b	160±8 ^{ab}	.034*
Karaciğer Ağırlığı	5.4±0.8 ^a	7.1±1.0 ^b	5.6±0.7 ^{ac}	6.4±0.6 ^b	.002*
Karaciğer İndeksi (%)	3.4±0.3 ^a	4.3±0.4 ^b	3.7±0.3 ^{ac}	4.0±0.4 ^{bc}	.001*
Böbrek Ağırlığı	0.7±0.0	0.8±0.1	0.7±0.0	0.8±0.0	.073
Böbrek indeksi (%)	0.4±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	.240
Kalp Ağırlığı	0.6±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0	.217
Kalp İndeksi (%)	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.02	0.4±0.0	.635

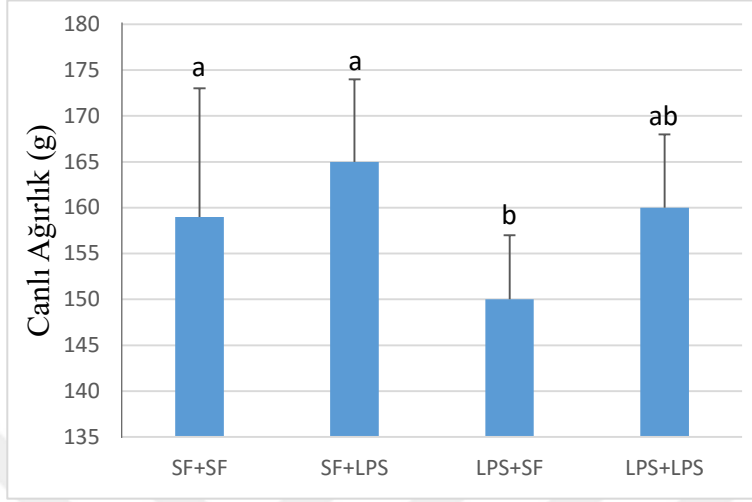
*Farklı harf bulunan gruplar istatistiksel olarak farklıdır. (Ortalama+ SS)

Tablo 4.1 de sıçanların canlı ve organ ağırlıkları incelendiğinde, canlı ağırlık istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en düşük ağırlık LPS+SF grubu olarak belirlenmiştir ve SF+SF ile SF+LPS gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın LPS+LPS grubu diğer üç gruba benzerlik göstermektedir.

Karaciğer ağırlığı istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en düşük ağırlık SF+SF grubu olarak bulunmuştur. Bu grup LPS+SF grubu ile benzer iken, SF+LPS ve LPS+LPS gruplarından farklı olduğu saptanmıştır.

Karaciğer indeksi istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu saptanmıştır ve en düşük indeks SF+SF grubu olarak bulunmuştur. Bu grup LPS+SF grubu ile benzerken, SF+LPS ve LPS+LPS gruplarından farklı olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen, ‘‘ böbrek ağırlığı’, ‘‘böbrek indeksi’, ‘‘kalp ağırlığı’’, ‘‘kalp indeksi’’ parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.

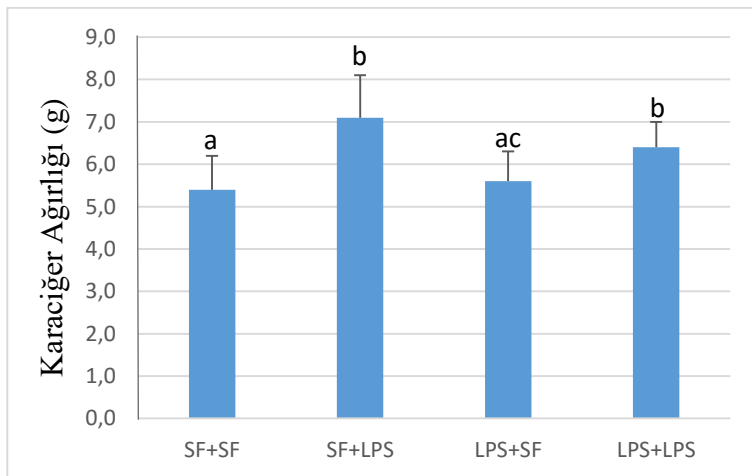


* P=0,034

Şekil 4.1. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Canlı Ağırlık Üzerine Etkileri.

Şekil 4.1’de incelenen LPS+SF grubunda canlı ağırlık SF+SF ve SF+LPS gruplarından daha düşük olup, istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (p=0,034).

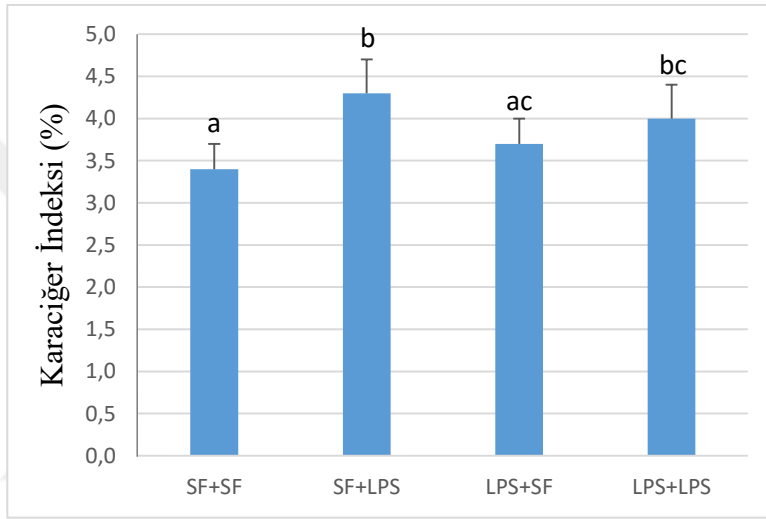
LPS+ SF grubunda canlı ağırlık SF+SF grubuna göre daha düşük olduğu için prenatal programlama olduğu düşünülmüştür.



*p=0,002

Şekil 4.2. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Karaciğer Ağırlığı Üzerine Etkileri.

Şekil 4.2’de incelenen LPS+SF grubunda karaciğer ağırlığı SF+LPS ve LPS+LPS gruplarından daha düşük olduğu saptanmış ve SF+SF grubu ise SF+LPS ve LPS+LPS gruplarından daha düşük olduğu belirlenmiş, gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p=0,002$).



* $p=0,001$

Şekil 4.3. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Karaciğer İndeksi Üzerine Etkileri.

Şekil 4.3’de incelenen SF+LPS grubunda karaciğer indeksi SF+SF ve LPS+SF gruplarından daha yüksek olup, SF+SF grubunda ise SF+LPS ve LPS+LPS gruplarından daha düşük olup, istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p=0,001$).

4.2. Hematolojik Parametreler

Aşağıda prenatal (18. gün) lipopolisakkarit (LPS) veya salin (SF) enjekte edilen sıçanlardan doğan yavrulara postnatal 60. günde LPS veya salin enjekte edildikten 4 saat sonra alınan kan örneklerinden hematolojik parametrelerine ilişkin bulgular sunulmuştur.

Tablo 4.2. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Hematolojik Parametre Değerleri.

	SF+SF	SF+LPS	LPS+ SF	LPS+LPS	p
Hematokrit (%)	42±3 ^a	41±3 ^a	47±3 ^b	41±4 ^a	.012*
Akyuvar Sayısı (#)	6000±2247	5733±1705	8517±2998	6288±2748	.289
Nötrofil Sayısı (#)	1059±642 ^a	2308±1213 ^b	2644±1445 ^b	2426±1580 ^b	.060
Nötrofil%	16±4 ^a	39±11 ^b	30±9 ^b	34±17 ^b	.001*
Lenfosit Sayısı (#)	4218±1340 ^a	2733±947 ^b	4671±1703 ^a	2584±1519 ^{ab}	.049*
Lenfosit%	72±6 ^a	48±11 ^b	56±11 ^b	56±17 ^b	.001*
Eozinofil Sayısı (#)	20±31 ^a	9±27 ^b	76±44 ^c	54±61 ^{bc}	.017*
Eozinofil %	0.1±0.3 ^a	0.3±0.5 ^{ab}	1.0±0.6 ^c	0.9±0.9 ^{bc}	.024*
Bazofil Sayısı (#)	390±197	344±120	541±206	334±234	.241
Bazofil %	6±1	6±2	7±1	6±1	.516
Monosit Sayısı (#)	330±186	341±143	478±226	268±219	.207
Monosit %	5±2	6±2	6±2	4±1	.224

*Farklı harf bulunan gruplar istatistiksel olarak farklıdır. (Ortalama+ SS)

Tablo 4.2 de sıçanların plazmalarından elde edilen hematolojik parametreler arasında Hematokrit yüzdesi istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en yüksek yüzde LPS+SF grubu olarak belirlenmiştir. Bu grup diğer üç gruptan istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın diğer üç grup birbirine benzer olduğu belirlenmiştir.

Nötrofil yüzdesi istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en düşük yüzde SF+SF grubu olarak saptanmıştır. Bu grup diğer üç gruptan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir. Fakat diğer üç grup birbirine benzer olup, fark bulunmamıştır.

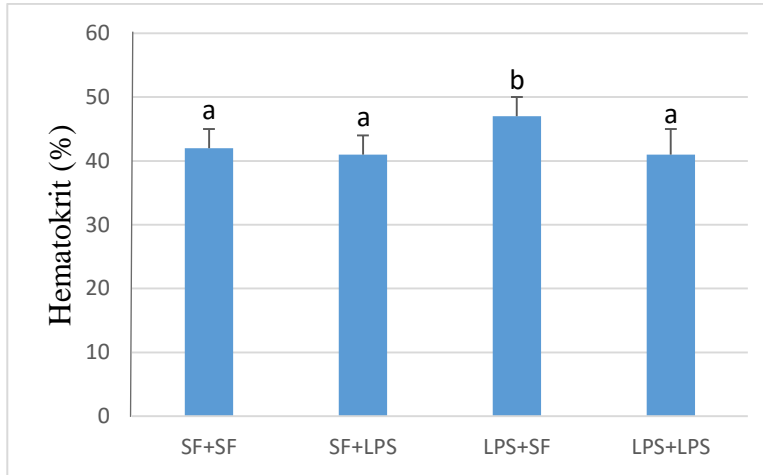
Lenfosit sayısı istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu belirlenmiştir ve en düşük sayı SF+LPS grubu olarak belirlenmiştir. Bu grup LPS+LPS grubu ile benzer iken, SF+SF ve LPS+SF gruplarından farklı olduğu saptanmıştır.

Lenfosit yüzdesi istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu saptanmıştır ve en yüksek yüzde SF+SF grubu olarak belirlenmiştir. Bu grup diğer üç gruptan istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın diğer üç grup birbirine benzer olduğu belirlenmiştir.

Eozinofil sayısı istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu saptanmıştır ve en yüksek sayı LPS+SF grubu olarak belirlenmiştir ve SF+SF ile SF+LPS gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. SF+SF grubu ise diğer üç gruptan farklılık göstermektedir.

Eozinofil yüzdesi istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu saptanmıştır ve en düşük yüzde SF+SF grubu olarak belirlenmiştir ve LPS+SF ile LPS+LPS gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın SF+LPS grubu ile benzerlik göstermektedir.

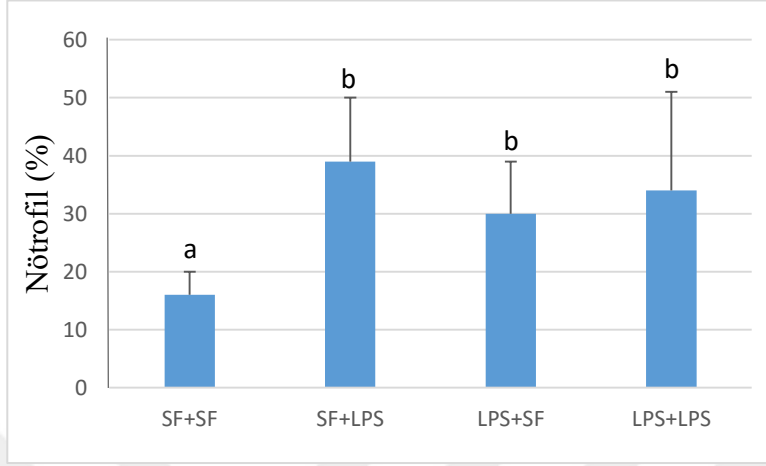
Araştırmada incelenen, ‘‘ akyuvar sayısı’’, ‘‘nötrofil sayısı’’, ‘‘ bazofil sayısı’’, ‘‘bazofil %’’, ‘‘monosit sayısı’’, ‘‘monosit %’’ parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.



*p=0.012

Şekil 4.4. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Hematokrit Düzeyi.

Şekil 4.4’de incelenen LPS+SF grubunun Hematokrit % oranı diğer üç gruptan yüksek olup, istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (p=0.012).

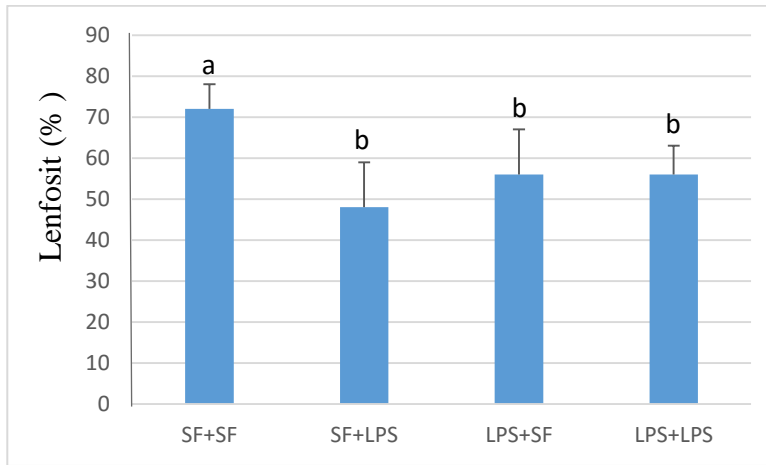


*P<0.001

Şekil 4.5. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Nötrofil Oranı.

Şekil 4.5’de incelenen SF+SF grubunun nötrofil oranı (%) diğer üç gruptan düşük bulunup, istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.001).

Nötrofil oranı (%) SF+LPS ve LPS+SF grupları, LPS+LPS grubuyla benzer olduğu için prenatal programlama olduğu düşünülmüştür.

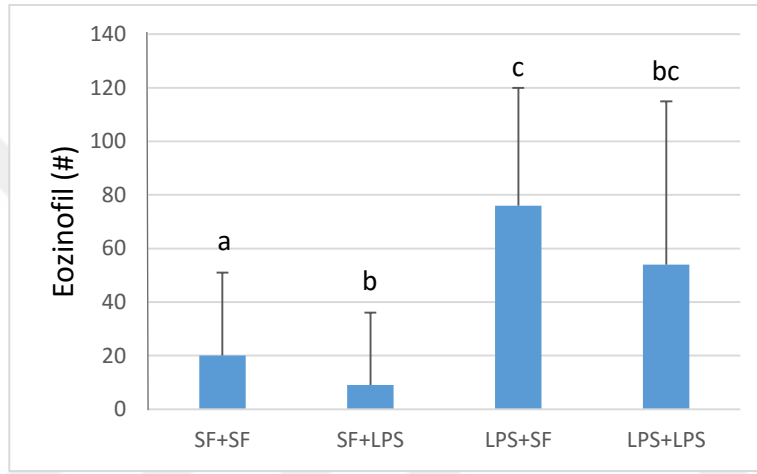


*P=0.00

Şekil 4.6. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Lenfosit Oranı.

Şekil 4.6' da incelenen SF+SF grubunun lenfosit % oranı diğer üç gruptan yüksek bulunup, istatiksel olarak farklı bulunmuştur ($p=0.001$).

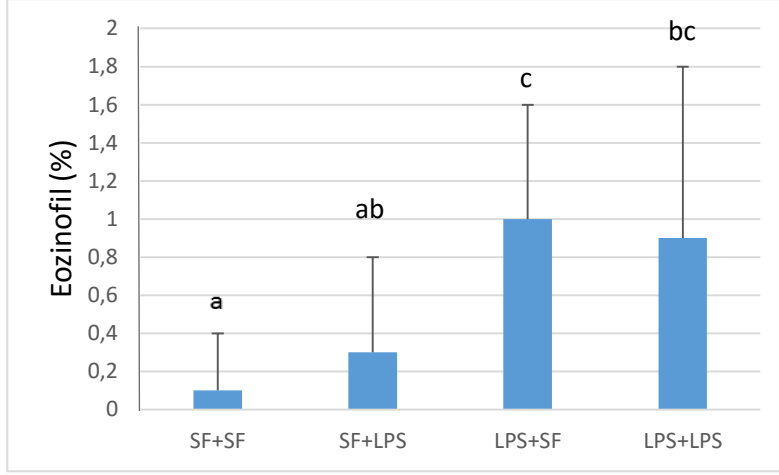
Lenfosit oranı (%) SF+LPS ve LPS+SF grupları, LPS+LPS grubuyla benzer olduğu için prenatal programlama olduğu düşünülmüştür.



* $p=0,017$

Şekil 4.7. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Eozinofil Sayısı.

Şekil 4.7' de incelenen LPS+SF grubunun eozinofil sayısı SF+SF, SF+LPS grubundan yüksek bulunup, istatiksel olarak farklı bulunmuştur ($p=0,034$).



*p=0,024

Şekil 4.8. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki Eozinofil Oranı.

Şekil 4.8' de incelenen SF+SF grubunun eozinofil oranı, LPS+SF grubundan düşük bulunup, istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (p=0,041).

4.3. Hormonal Parametreler ve Sitokinler

Aşağıda prenatal (18. gün) lipopolisakkarit (LPS) veya salin (SF) enjekte edilen sıçanlardan doğan yavrulara postnatal 60. günde LPS veya salin enjekte edildikten 4 saat sonra alınan kan örneklerinden hormon ve sitokin parametrelerine ilişkin bulgular sunulmuştur.

Tablo 4.3. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğinde Hormonal Parametreler ve Sitokinlerin Değerlendirilmesi.

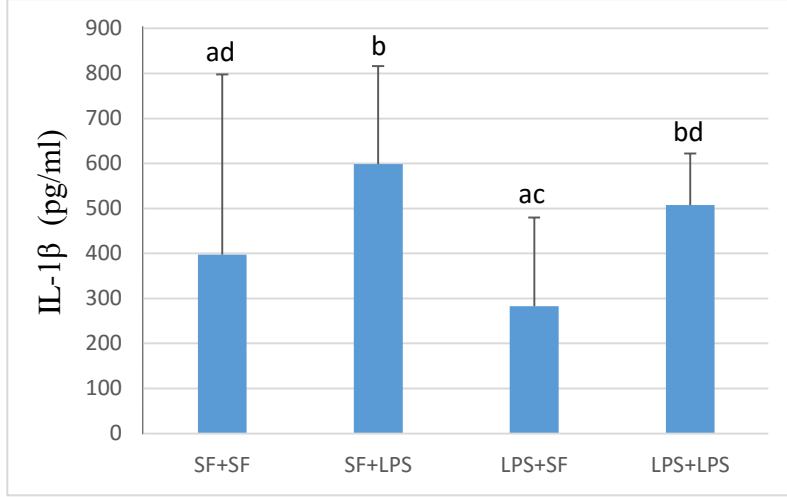
	SF+SF	SF+LPS	LPS+ SF	LPS+LPS	p
FSH (ng/ml)	14.9±1.5	16.8±6.5	16.9±3.9	18.2±2.7	.111
LH (ng/ml)	1.3±0.5	3.0±5.1	1.5±0.7	3.8±1.3	.975
Kortikosteron (ng/ml)	133.6±17.5	118.8±18.9	110.5±17.9	124.9±22.8	.081
TNF-α (pg/ml)	15.0±0.0 ^a	53.8±57.6 ^{ac}	15.0±0.0 ^a	104.5±84.1 ^{bc}	.005*
IL-1β (pg/ml)	397.7±400.0 ^{ad}	598.4±217.9 ^b	282.7±197.3 ^{ac}	507.3±114.5 ^{bd}	.032*

*Farklı harf bulunan gruplar istatistiksel olarak farklıdır. (Ortalama+ SS)

Tablo 4.3 de sıçanların serumlarından elde edilen hormonal parametreler ve sitokinler arasında, TNF- α istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en yüksek düzey LPS+LPS grubu olarak belirlenmiştir ve SF+SF ile LPS+SF gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın diğer üç grup birbirleriyle benzerlik göstermektedir.

IL-1 β istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en yüksek düzey SF+LPS grubu olarak belirlenmiştir ve SF+SF ile LPS+SF gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın SF+SF ile LPS+SF grupları birbirleriyle benzerlik göstermektedir.

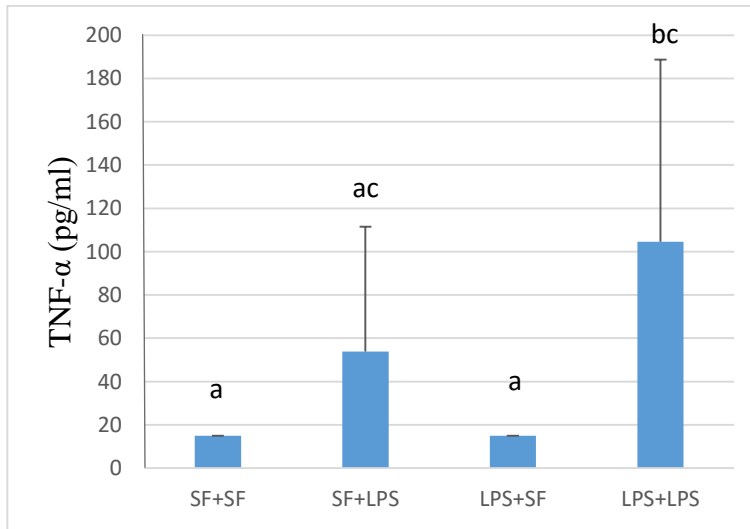
Araştırmada incelenen, ‘FSH’, ‘LH’, ‘Kortikosteron’ parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir.



*p=0,032

Şekil 4.9. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki IL-1 β Düzeyi.

Şekil 4.9' da incelenen serum IL-1 beta düzeyi SF+LPS grubu SF+SF ve LPS+SF yüksek olup, LPS+LPS grubu ise LPS+SF grubundan yüksek bulunup, istatistiksel olarak farklıdır (p=0,032).



*p=0,004

Şekil 4.10. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edildikten 4 Saat Sonra Alınan Kan Örneğindeki TNF-A Düzeyi.

Şekil 4.10' da incelenen LPS+LPS grubunda serum TNF-alfa düzeyi SF+SF ve LPS+SF gruplarından daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,004)

4.4. Oksidatif Stres Parametreleri

Aşağıda prenatal (18. gün) lipopolisakkarit (LPS) veya salin (SF) enjekte edilen sıçanlardan doğan yavrulara postnatal 60. günde LPS veya salin enjekte edilmesinin kalp, böbrek, karaciğer dokuları üzerinde oksidatif stress parametrelerine ilişkin bulgular sunulmuştur.

Tablo 4.4. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Organlarda Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkileri.

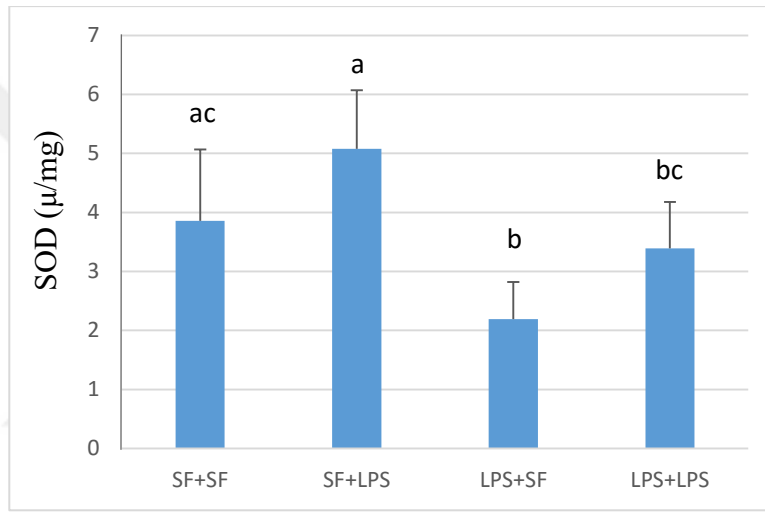
	SF+SF	SF+LPS	LPS+ SF	LPS+LPS	P
Kalp					
SOD (μ /mg)	3.86 \pm 1.21 ^{ac}	5.08 \pm 0.99 ^a	2.19 \pm 0.63 ^b	3.39 \pm 0.79 ^{bc}	.000*
CAT (k/gr)	0.72 \pm 0.06 ^a	0.74 \pm 0.06 ^{ab}	0.81 \pm 0.06 ^b	0.75 \pm 0.08 ^{ab}	.036*
MDA (nmol/g)	6.72 \pm 2.09	6.82 \pm 1.00	7.81 \pm 2.24	7.54 \pm 1.54	.522
GSH (μ mol/ g)	8.38 \pm 2.05	8.56 \pm 0.91	8.72 \pm 0.60	8.27 \pm 1.00	.902
Böbrek					
SOD (μ /mg)	15.39 \pm 3.64	18.16 \pm 5.86	19.44 \pm 4.63	15.91 \pm 2.37	.210
CAT (k/gr)	0.56 \pm 0.04	0.56 \pm 0.04	0.56 \pm 0.04	0.54 \pm 0.04	.799
MDA (nmol/g)	18.11 \pm 2.06	17.54 \pm 1.32	17.27 \pm 2.77	16.33 \pm 2.00	.376
GSH (μ mol/g)	4.01 \pm 0.43	3.71 \pm 0.44	4.27 \pm 0.32	3.94 \pm 0.82	.223
Karaciğer					
SOD (μ /mg)	9.47 \pm 2.16	10.36 \pm 2.92	9.34 \pm 1.98	7.75 \pm 1.57	.141
CAT (k/gr)	0.60 \pm 0.03	0.64 \pm 0.04	0.61 \pm 0.05	0.61 \pm 0.05	.312
MDA (nmol/g)	31.40 \pm 8.26	39.16 \pm 7.79	32.58 \pm 6.51	30.24 \pm 10.82	.142
GSH (μ mol/g)	5.44 \pm 2.08	7.11 \pm 2.17	7.12 \pm 3.55	7.89 \pm 2.57	.279

*Farklı harf bulunan gruplar istatistiksel olarak farklıdır. (Ortalama+ SS)

Tablo 4.4 de sıçanların kalp, böbrek ve karaciğer dokularından elde edilen oksidatif stress parametrelerinden kalp dokusunda ‘‘süperoksit dismutaz (SOD)’’ ve ‘‘katalaz (CAT)’’ enzimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.005$). Gruplar arasında farklı harf bulunanlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat incelenen kalp dokusunda ‘‘MDA’’, ‘‘GSH’’ ve karaciğer, böbrek dokusunda ‘‘SOD’’, ‘‘CAT’’, ‘‘MDA’’, ‘‘GSH’’ parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.

Kalp dokusunda incelenen süperoksit dismutaz istatikselsel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en düşük LPS+SF grubu olarak belirlenmiştir ve SF+SF ile SF+LPS gruplarından farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın SF+SF ile SF+LPS gurubu birbiriyle benzerlik göstermektedir.

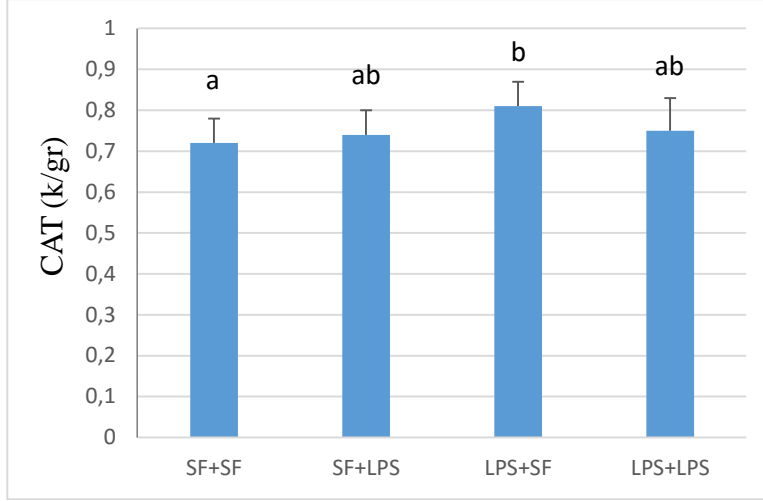
Kalp dokusunda incelenen katalaz istatikselsel olarak gruplar arasında farklı olduğu bulunmuştur ve en düşük SF+SF grubu olarak belirlenmiştir ve LPS+SF grubundan farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın LPS+SF grubu SF+LPS ve LPS+LPS gurubu ile benzerlik göstermektedir.



*p=0,000

Şekil 4.11. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Kalp Dokusunda SOD Üzerine Etkisi.

Şekil 4.11' de incelenen oksidatif stres parametrelerinden SOD enzimi LPS+SF grubunda SF+LPS ve SF+SF gruplarından düşük bulunup, SF+LPS grubu ise LPS+LPS grubundan yüksek bulunup istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000).



*p=0,036

Şekil 4.12. Prenatal (18. Gün) Lipopolisakkarit (LPS) veya Salin (SF) Enjekte Edilen Sıçanlardan Doğan Yavrulara Postnatal 60. Günde LPS veya Salin Enjekte Edilmesinin Kalp Dokusunda CAT Üzerine Etkisi.

Şekil 4.12' de incelenen oksidatif stres parametrelerinden CAT enzimi LPS+SF grubunda SF+SF grubundan yüksek bulunup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,036).

5. TARTIŞMA

Bu araştırma ile prenatal dönemde 50 µg/kg dozunda LPS enjekte edilen sıçanlardan doğan yavruların postnatal canlı ağırlıkları düşmüş olduğu belirlenmiştir. Wang ve ark. farelere gebeliğin 13-17. günleri arasında her gün LPS enjekte etmişler (50 µg/kg) ve fetal ağırlığın erkek ve dişi sıçanlarda düştüğünü tespit etmişlerdir (15). Hodyl ve ark. sıçanlara gebeliğin 16, 18 ve 20. günlerinde 200µg/kg dozunda LPS enjekte etmiş ve gebeliğin 20. günündeki fetal ağırlığın ve doğum ağırlığının düştüğünü gözlemlemişlerdir (erkek ve dişi belirtilmemiş) (82). Bernardi ve ark. , sıçanlara gebeliğin 21. gününde LPS enjekte etmişler (250 µg/kg) ve postnatal 2. günde erkek yavrularda canlı ağırlığın düştüğünü belirlemişlerdir (20). Bu çalışmalarını incelediğimizde genel olarak prenatal LPS enjeksiyonlarının yavruların canlı ağırlıklarını düşürdüğü belirlenmiştir. Golan ve ark (2005) fareler üzerine yaptığı çalışmada, prenatal 17. günde 0.12 µg/g dozunda LPS enjeksiyonunun yeni doğan yavrunun ilk aylarında ağırlık üzerine etkili olmadığını saptamıştır (31). Öte yandan, Gao ve ark. prenatal LPS enjeksiyonlarının canlı ağırlığı artırdığını bulmuşlardır (45). Fakat Gao ve ark.'nın çalışmasında LPS mevcut tez çalışması (50 µg/kg) ve diğer çalışmalara göre çok yüksek dozda verilmiştir. Farklı dozda LPS'nin farklı immun mekanizmaları tetiklemiş olabileceği düşünülebilir (83). Ayrıca, gebeliğin dönemi de LPS'lere verilen yanıtı etkileyebilecektir (84).

Bu araştırma ile postnatal LPS karaciğer ağırlığını ve karaciğer indeksini yükseltmiş olduğu saptanmıştır. Cani ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada LPS uygulamasının 24 saat sonra beden ağırlığına göre karaciğer ağırlığını artırdığını saptamışlardır (85). Jepson ve ark. yaptığı çalışmada sıçanlara verilen LPS ilk 24 saatte karaciğer protein / vücut ağırlığı oranı artırmıştır (87). Yine benzer şekilde LPS enjeksiyonlarının diğer bazı organların ağırlıklarını da artırdıkları tespit edilmiştir. Nitekim Chen ve ark. 10000 µg/kg dozunda LPS uyguladığında farelerde böbrek indeksinin (böbrek ağırlığı/ beden ağırlığı) arttığını belirlemişlerdir (88). Khodir ve ark. (2015) da 10000 µg/kg dozunda LPS verilen sıçanlarda 24 saat içinde kalp indeksinin (kalp/ beden ağırlığı) arttığını belirlemişlerdir (89).

Bu çalışma ile hematokrit değerinin, postnatal dönemde yapılan LPS (SF+LPS grubu) enjeksiyonundan 4 saat sonra alınan kan örneklerinde kontrol grubuna değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Kao ve ark. yaptıkları çalışmada ise 10000 µg/kg dozunda LPS enjekte etmişler ve enjeksiyon sonrası 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6. saatlerde kan örnekleri

almışlardır. Enjeksiyondan sonraki ilk 1 saat içinde hematokrit değeri düşmüş fakat daha sonra normal düzeye gelmiştir (90). Mevcut çalışmadaki veriler (SF+LPS grubu) bu açıdan ele alındığında, postnatal LPS sonrasında 4. saatte alınan kan örneklerinde, hematokrit değerinin yükselmeyi müteakip normal düzeye indiği değerlendirilmiştir. Öte yandan, prenatal dönemde maternal olarak enjekte edilen LPS (LPS+SF grubu) hematokrit değerini artırmışken hem prenatal hem de postnatal LPS enjekte edilen grupta (LPS+LPS grubu) hematokrit değerinin kontrol grubuyla benzer bulunması; prenatal bir programlama bulunduğu ve bu etkinin ikinci LPS enjeksiyonuyla maskelendiğini düşündürmektedir.

Bu araştırmada, LPS ile prenatal ve/veya postnatal immün uyarılmaların nötrofil % oranını yükselttiği ve lenfosit % oranını düşürdüğü belirlenmiştir. Benzer şekilde, Hodyl ve ark. prenatal (gebeliğin 16. 18. ve 20. günlerinde) LPS uygulamasının ardından postnatal 50. günde LPS enjeksiyonunun 4 saat sonra lenfosit sayısını anlamlı derecede düşürdüğünü tespit etmişler fakat nötrofil sayısının ise değişmediğini belirlemişlerdir (82). Öte yandan Doursout ve ark. erkek sıçanlara 35000 µg/kg LPS enjekte ettikten 6 saat sonra nötrofil sayısı en yüksek düzeyde bulunmuştur (91). Mevcut çalışmada da, hem akut dönemde hem de uzun vadede, LPS enjeksiyonlarının nötrofil sayısını veya % oranını artırdığı belirlenmiştir. Bu açıdan yaklaşıldığında, prenatal dönemde yapılan bir LPS enjeksiyonun, postnatal 60. günde nötrofil sayısını yükseltmiş olması (LPS+SF grubunda) prenatal bir programlamanın olduğunu düşündürmektedir. Zager ve ark. da fareler üzerinde yaptıkları çalışmada prenatal 17. günde LPS enjekte etmiş ve postnatal 70. günde nötrofil aktivitelerinin değişmediğini belirlemiş ve nötrofil aracılı doğal bağışıklığa etki etmediği sonucuna varmışlardır (92). Buna karşın, mevcut tez çalışmasında, prenatal dönemde yapılan tek LPS enjeksiyonu doğan yavrunun kanındaki savunma hücrelerinin sayısını ve oranını postnatal 60.güne kadar kalıcı olarak programlanmış gözükmektedir. Bu bağlamda, nötrofil yüzde oranı iki kat daha yüksekken lenfosit yüzde oranı 1/3 oranında düşmüştür. Dadelszen ve Luo' nun bildirildiğine göre neonatal ve maternal nötrofil yaşam süresinin, gebe olmayanlara göre yükseldiği ve bunun nötrofil apoptozunun gecikmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (93, 94). Mevcut çalışmada da nötrofil sayısının artmış olması, nötrofil apoptozunun LPS enjeksiyonuyla geciktirilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim LPS ile maruziyetin nötrofil apoptozunu geciktirdiği ve nötrofil sayısını artırdığı belirlenmiştir (95, 96). Prenatal

dönemde yapılan LPS enjeksiyonunun apoptoz mekanizması üzerine etkilerinin ayrıca incelenmesi önemli gözükmetedir.

Mevcut tez çalışmasında, kortikosteron düzeyi LPS veya salin grubunda hem prenatal hem de postnatal dönemde farklı bulunmamıştır. Hodly ve ark. de prenatal 20. günde 200 µg/kg dozunda LPS enjeksiyonu fetal kortikosteron düzeyini artırmıştır (82). Williams ve ark. fareler üzerine yaptıkları çalışmada prenatal LPS nin yavruların serum kortikosteron seviyesini etkilemediğini bulmuşlardır (28). Enayati ve ark. prenatal 15, 16 ve 17. günlerde 50, 300, 500 µg/kg dozunda farelere LPS enjeksiyonu yapılmıştır. Yüksek doz uygulananlarda postnatal 40. ve 80. günlerde kortikosteron seviyesi yüksek bulunmuştur. Düşük dozda yapılan LPS kortikosteron seviyesi üzerine etki etmemiştir (36). Dolayısıyla yukarıdaki araştırma, mevcut tez çalışmasında enjekte edilen 50 µg/kg LPS dozunun etki etmemesi ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada postnatal LPS enjeksiyonundan 4 saat sonrası TNF-alfa ve IL-1beta düzeyi yüksek bulunmuştur. Prenatal LPS enjeksiyondan 60 gün sonra değerlendirilen TNF- α ve IL-1 β düzeyini etkilememiştir. Kao ve ark. ratlar üzerine yaptıkları çalışmada 100 µg/kg dozunda LPS enjeksiyonunun 3 saat sonra TNF- α ve IL-1β düzeyinin artışına sebep olduğunu bulmuşlardır (90). Hodyl ve ark. sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmada prenatal 200 µg/kg dozunda LPS ve postnatal 50. günde 50 µg/kg dozunda LPS enjeksiyonundan 4 saat sonra TNF- α ve IL-1β düzeyinin yükseldiğini saptamışlardır (82). Solati ve ark. yaptıkları çalışmada prenatal 10. günde 1, 5 ve 10 µg/kg dozunda uygulanan LPS postnatal 21. günde erkek farelerde TNF- α ve IL-1β düzeyinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır (26). Çalışmamızda kullanılan LPS dozu, literatürde de yaygın olarak kullanılan ve immun yanıtı uyaran bir dozdur (15, 27, 36, 35, 97). Nitekim ikinci LPS enjeksiyonundan sonra TNF-alfa ve IL-1beta düzeylerinin 4 saat sonra yüksek tespit edilmiş olması bunun kanıtıdır. Öte yandan, Hodyl ve ark.'nın prenatal dönemde kullandığı LPS dozu mevcut çalışmadakinden daha yüksektir (82). Solati ve ark.'nın prenatal dönemde kullandığı doz ise mevcut çalışmadankinden dahi düşüktür (26). Bu nedenle prenatal dönemde uygulanan dozun 200 µg/kg'dan düşük olması durumunda, postnatal sitokin yanıtı artışının oluşmama olasılığından bahsedilebilir. Nitekim Lasala ve ark. prenatal 18. günde 500 µg/kg dozunda LPS veya salin enjekte etmişlerdir ve bu sıçanlardan doğan yavrulara 21. günde LPS veya salin enjekte ettikten 2 saat sonra kanları alınmıştır. Yavrularda prenatal salin sonrası, postnatal LPS enjekte edilen grupta TNF- α ve IL-1β seviyesi anlamlı derecede yüksek bulunmuş

olması doz-bağımlı hipotezi destekler görünmektedir (50). Bununla beraber, Solati ve ark. prenatal 20. günde 30, 60, 120, 240, 480 µg/kg dozlarında enjekte edilen LPS, postnatal 60. ve 70. günlerde erkek farelerde TNF- α ve IL-1β düzeyinde herhangi bir değişime sebep olmadığını belirlemişlerdir. Fakat söz konusu çalışmada kan örnekleri gözün retro-orbital ven pleksusundan alınmıştır (98).

Bu çalışma ile kalp, böbrek ve karaciğer dokusunda incelenen oksidatif stres parametreleri yalnızca kalp dokusunda farklılık göstermiştir. Kalp dokusunda da lipit peroksidasyonu (MDA) ve GSH değişiklik göstermemiştir. Postnatal LPS kalp dokusunda SOD değerini yükseltmişken, prenatal LPS ve sonrasında postnatal LPS uygulanması ise SOD değerini düşürmüştür. CAT değerleri de prenatal LPS enjekte edilen grupta, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Kalp dokusunda LPS enjeksiyonuna bağlı olarak oksidatif stresi inceleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Tamion ve ark. sıçanların kalp dokusunda oksidatif parametreleri inceledikleri çalışmada 50000 µg/kg dozunda LPS uygulamasının 2 saat sonrası GSH seviyesinin etkilenmediğini bulmuşlardır (99). Sebai ve ark. ise sıçanların kalp dokusunda oksidatif parametreleri inceledikleri çalışmada 8000 µg/kg dozunda LPS uygulanmasından 24 saat sonra MDA seviyesinde artış saptanırken, SOD ve CAT gibi parametrelerin düştüğünü saptamışlardır (100). Ben-Shaul ve ark. sıçanların kalp dokusunda oksidatif parametreleri inceledikleri çalışmada 20000 µg/kg dozunda LPS uygulamasından 24 saat sonra MDA, SOD ve CAT seviyesinde artış saptarken GSH-Px seviyesinde herhangi bir değişiklik saptamamışlardır (101). Her üç çalışmada da kullanılan LPS dozu, mevcut çalışmadakinden (50 µg/kg) çok daha yüksektir. Recknagel ve ark. ise 1000 µg/kg, 30000 µg/kg LPS dozunun karaciğerde oksidatif parametreler üzerine doz düzeyinin etkili olduğunu saptamışlardır (102). Nitekim yüksek dozda LPS kullanılarak yapılan çalışmalarda böbrekler ve karaciğer üzerinde de 24 saat içerisinde oksidatif parametrelerde değişiklikler oluşmuştur. Sıçanlara 8000 µg/ kg dozunda LPS uygulaması karaciğer ve böbrek dokularının MDA değerini yükseltirken, CAT aktivitesini ise düşürmüştür (103, 104). LPS'nin 500 µg/kg dozunda kullanılması karaciğer dokusunda SOD ve GSH-Px değerini düşürmüştür, CAT değerini ise yükseltmiş fakat GSH değerini değiştirmemiştir (105).

Öte yandan literatür incelendiğinde, prenatal LPS enjeksiyonunun postnatal oksidatif stres parametreleri üzerine etkisine ilişkin herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır.

Ayrıca, prenatal dönemde LPS enjeksiyonunu takiben postnatal LPS enjeksiyonuna verilecek oksidatif-antioksidatif yanıt da incelenmemiştir. Bu açıdan yaklaşıldığında mevcut tez çalışması bir ilk olup; elde edilen bulgular özellikle kalp dokusu SOD ve CAT düzeyleri için prenatal-postnatal etkileşimin söz konusu olabileceğini göstermektedir. Böyle bir etkileşimin önemli pratik sonuçları olabileceğinden, konuyla ilgili yeni çalışmaların farklı dozları ve hayati dokuları ele alarak yapılması gerektiği sonucuna varılabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar;

Sıçanlarda bakteriyel enfeksiyonların prenatal-postnatal etkileşimini inceleyen mevcut tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- Prenatal bakteriyel enfeksiyon, yavruların canlı ağırlıklarını düşürmüş, nötrofillerin % oranını yükseltmiş ve lenfositlerin % oranını düşürmüştür ve bu nedenle prenatal bir programlamanın oluştuğu düşünülmüştür;
- Postnatal bakteriyel enfeksiyon, karaciğer ağırlığını, karaciğer indeksini ve TNF-alfa ile IL-1beta düzeylerini yükseltmiştir;
- Prenatal dönemde bakteriyel enfeksiyon geçiren sıçan yavrularının postnatal dönemde tekrar enfeksiyona maruz kalması kortikosteron düzeyini etkilemezken kalp dokusunda SOD düzeyini düşürmüştür.
- Bir diğer ifadeyle bakteriyel enfeksiyonlar prenatal dönemde oluşurlarsa postnatal 60. günde immünolojik savunma hücrelerini etkilerken, sitokinler ve HPG aksında değişikliğe yol açmamıştır. Postnatal bakteriyel enfeksiyonlar ise kısa vadede (4 saat içinde) karaciğer ağırlığı ile sitokinleri artırmıştır.

Öneriler;

Mevcut çalışma, prenatal bakteriyel enfeksiyonların uzun vadede postnatal hayati parametreleri etkileyebileceğini (canlı ağırlık, savunma hücreleri) ve prenatal dönemdeki bakteriyel enfeksiyonların postnatal dönemde oluşan bakteriyel enfeksiyonlarla yanıtı modifiye edebileceğini gösterdiğinden,

- Prenatal ve postnatal dönemlerde ve farklı günlerde yapılması,
- Farklı dozları içeren yeni çalışmalar yapılması,
- Canlı ağırlık değişimlerinin detaylı (haftalık) incelenmesi, önerilebilir.

KAYNAKLAR

- 1- Aly HA, Lightfoot DA, El-Shemy HA. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Toxicology in Vitro* 2010, 24: 1266–72.
- 2- Mohamadina AM, Elberry AA, Mohamed A, Elkablawy HS, Gawad A, Abbasi FAA. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiology* 2011, 18: 235–42.
- 3- Geyik S, Kumcu EK, Büyüknaca HS, Arıdoğan A, Göçmen C, Önder S. Effects of vitamin E and sodium selenate on impaired contractile activity by bacterial lipopolysaccharide in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2009, 380: 1–9.
- 4- Yang CC, Ma MC, Chien CT, Wu MS, Sun WK, Chen CF. Hypoxic preconditioning attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat kidneys. *J Physiol* 2007, 582: 407–19.
- 5- Dong HP, Chunag IJ, Wang DC, Huang LJ, Lee CI, Tsai JH, Yang RC. Lipopolysaccharide-stimulated leukocytes contribute to platelet aggregative dysfunction, which is attenuated by catalase in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 2010, 26(11): 584-92.
- 6- Rémacle C, Bieswal F, Bol V, Reusens B. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition. *Am J Clin Nutr* 2011, 4: 1-7.
- 7- Reusens B, Theys N, Dumortier O, Goosse K, Rémacle C. Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny. *Am J Clin Nutr* 2011, 94: 1824–9.
- 8- Mohn CE, Solari JF, Laurentiis AD, Bornstein SR, Bornstein ME, Rettori V. Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. *Stress* 2011, 14(2): 216-26.
- 9- Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002, 71: 635–700.
- 10- Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003, 338(23): 2431–47.
- 11- Topçu WT, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıklar ve Mikrobiyolojisi, 1. Baskı. İstanbul, Nobel tıp kitapevi 2002: 110.

- 12- İskit AB. Sepsiste Deneysel Modeller, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, *Yoğun Bakım Dergisi* 2005, 5(2): 133-6.
- 13- Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, 216: 15-37.
- 14- Endotoxin lipopolysaccharide schematic. (http://hermes.mbl.edu/marine_org/images/animals/Limulus/blood/lps.html) 8 Temmuz 2015.
- 15- Wang H, Yang LL, Hu YF, Wang BW, Huang YY. Maternal LPS Exposure during Pregnancy Impairs Testicular Development, Steroidogenesis and Spermatogenesis in Male Offspring. *Plos One* 2014, 9(9): e106786.
- 16- Hurley JC. Concordance of endotoxemia with gram-negative bacteremia in patients with gram-negative sepsis: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 2120–7.
- 17- Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 7534–39.
- 18- Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction* 2003, 125: 95–110.
- 19- Chen YH, Zhao M, Chen X, Zhang Y, Wang H. Zinc supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced fetal growth restriction and demise through its anti-inflammatory effect. *J Immunol* 2012, 189: 454–63.
- 20- Bernardi MM, Kirsten TB, Matsuoka SM, Teodorov E, Habr SF, Penteadó SH, Palermo-Neto J. Prenatal Lipopolysaccharide Exposure Affects Maternal Behavior and Male Offspring Sexual Behavior in Adulthood. *Neuroimmunomodulation* 2010, 17(1): 47-55.
- 21- French SS, Chester EM, Demas GE. Maternal immune activation affects litter success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring. *Physiol Behav* 2013, 2(119): 175-84.
- 22- Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior and Immunity* 2012, 26: 623–34.

- 23- Holekamp KE, Dlioniak SM. Maternal effects in mammals. Chicago: University of Chicago Press; 2009: 227-5.
- 24- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006, 26: 4752–62.
- 25- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2004, 61(8): 774-80.
- 26- Solati J, Hajikhani R, Rashidieh B, Fatipour Jalilian M. Effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on reproductive activities and serum concentrations of pituitary-gonadal hormones in mice offspring. *Int J Fertil Steril* 2012, 6(1): 51-8.
- 27- Hodyl NA. Innate immune dysfunction in the neonatal rat following prenatal endotoxin exposure. *J Neuroimmunol* 2008, 204: 126–30.
- 28- Williams CL, Teeling JL, Perry VH and Fleming TP. Williams et al. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. *BMC Biology* 2011, 9: 49-51.
- 29- Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage and cognitive limitation in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil* 2002, 8: 46-50.
- 30- Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol. Neonate* 2001, 79: 224-7.
- 31- Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005, 48: 903-17.
- 32- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000, 118: 503-8.
- 33- Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 2009, 3(14): 1-14.
- 34- Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah, M, Parner ET. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2010, 40: 1423– 30.

- 35- Elovitz MA, Brown AG, Breen K, Anton L, Maubert M, Burd I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. *Int. J. Devl Neuroscience* 2011, 29: 663–71.
- 36- Enayatia M, Solati J, Hosseinic MH, Shahia HR, Sakid G, Salari AA. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. *Brain Research Bulletin* 2012, 87: 295–302.
- 37- Lowe GC, Luheshi GN, Williams S. Maternal infection and fever during late gestation are associated with altered synaptic transmission in the hippocampus of juvenile offspring rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 295: 1563–71.
- 38- Getahun D, Ananth CV, Oyelese Y, Peltier MR, Smulian JC, Vintzileos AM. Acute and chronic respiratory diseases in pregnancy: associations with spontaneous premature rupture of membranes. *J Maternal Fetal Neonatal Medicine* 2007, 20: 669–75.
- 39- Velten M, Britt JRD, Heyob KM, Welty SE, Eiberger B, Tipple TE, Rogers LK. Prenatal inflammation exacerbates hyperoxia induced functional and structural changes in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012, 303: 279–90.
- 40- Kirsten TB, Oliveira BPS, Oliveira APL, Kieling K, Lima WT, Neto JP, Bernardi MM. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure prevents subsequent airway inflammation response in an experimental model of asthma. *Life Sciences* 2011, 89: 15–9.
- 41- Wei YL, Li XH, Zhou JZ. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28: 651–6.
- 42- Zhao S, Zhang H, Cao D, Liu Y, Li X. Lipopolysaccharide Exposure during Pregnancy Leads to Aortic Dysfunction in Offspring Rats. *PLoS ONE* 2014, 9(7): e102273.
- 43- Hao1 XQ, Zhang HG, Yuan ZB, Yang DL, Hao LY, Li XH. Prenatal exposure to lipopolysaccharide alters the intrarenal renin–angiotensin system and renal damage in offspring rats. *Hypertension Research* 2010, 33: 76–82.
- 44- Haoa XQ, Konga T, Zhangc SY, Zhaoa ZS. Alteration of embryonic AT2-R and inflammatory cytokines gene expression induced by prenatal exposure to

- lipopolysaccharide affects renal development. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013, 65: 433–9.
- 45- Gao M, Zhang X, Chen X, Mi C, Tang Y. Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide Results in Local RAS Activation in the Adipose Tissue of Rat Offspring. *PLoS ONE* 2014, 9(10): 1371-6.
- 46- Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, 25: 562–9.
- 47- Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH. Endotoxin induced chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171: 73-7.
- 48- Surriga O, Ortega A, Jadeja V, Bellafronte A, Lasala N, Zhou H. Altered hepatic inflammatory response in the offspring following prenatal LPS exposure. *Immunology Letters* 2009, 123: 88–95.
- 49- Gerhold K, Avagyan A, Seib C, Frei R, Steinle J, Ahrens B, Dittrich AM, Blumchen K, Lauener R, Hamelmann E. Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118: 666-73.
- 50- Lasala N, Zhou H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. *Journal of Neuroimmunology* 2007, 189: 95–101.
- 51- Hodyl NA, Walker FR, Krivanek KM, Clifton VL, Hodgson DM. Prenatal endotoxin exposure alters behavioural pain responses to lipopolysaccharide in adult offspring. *Physiology & Behavior* 2010, 100: 143–7.
- 52- Isolauri E, Huurre A, Salminen S, Impivaara O. The allergy epidemic extends beyond the past few decades. *Clin Exp Allergy* 2004, 34: 1007-10.
- 53- Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, Quattrocchi C, Mesaros S, Stojavljevic N. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *Journal Neuroimmunol* 2009, 207: 101–06.
- 54- Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly* 2012, 142: 13590.
- 55- Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun* 2004, 5(8): 609–14.

- 56- Aggelakis K, Zacharaki F, Dardiotis E, Xiromerisiou G, Tsimourtou V, Ralli S, et al. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Greek multiple sclerosis (MS) patients with bout-onset MS. *Neurol Sci* 2010, 31(3): 253–7.
- 57- TNF-Alpha.
http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2000/wolf/tnf_alpha.html 20 Temmuz 2015.
- 58- Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2014, 25: 453–72.
- 59- Michalska AG, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports* 2013, 65: 1655-62.
- 60- Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell* 2003, 115: 61–70.
- 61- Stamou P, Kontoyiannis DL. Posttranscriptional regulation of TNF mRNA: a paradigm of signal-dependent mRNA utilization and its relevance to pathology. *Curr Dir Autoimmun* 2010, 11: 61–79.
- 62- Catalani A, Alemà GS, Cinque C, Zuena AR, Casolini P. Maternal corticosterone effects on hypothalamus–pituitary–adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2013, 35: 1502–17.
- 63- Harbuz M. Neuroendocrine function and chronic inflammatory stress. *Experimental Physiology* 2002, 87: 519–25.
- 64- Vreugdenhil E, Kloet ER, Schaaf M, Datson NA. Genetic dissection of corticosterone receptor function in the rat hippocampus. *European Neuropsychopharmacology* 2001, 11: 423–30.
- 65- Maccari S, Morley FS.. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32: 10–15.
- 66- Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology* 2012, 233: 12–21.

- 67- Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2010, 15: 186-90.
- 68- Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devil is in the details. *Pediatric Research* 2009, 66: 121-27.
- 69- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001, 54: 176-86.
- 70- Perrona S, Tatarano MS, Stazzoni G, Buonocore G. Oxidative stress and free radicals related diseases of the newborn. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2012, 3: 1043- 50.
- 71- Toro J, Rodrigo R. Oxidative stress: Basic overview. *Nova Science Publishers, Inc* 2009 Ed Rodrigo R. Chapter 1 ISBN:978-1-60741-554-1
- 72- Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2011, 31: 137-50.
- 73- Lushchak VI Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014, 28: 164-75.
- 74- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Husak VV, Luzhna LL, Lushchak OV, Storey KB. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues, *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2005, 37: 1670–80.
- 75- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Katayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012, 5(1): 9–19.
- 76- Demir T, Aydemir A, Güler S, Serdaroğlu E, Kurutepe M, Donma O, Yıldırım N. Akut ve stabil KOAH olgularında oksidatif stres. *Solunum* 1999, 1: 43-47.
- 77- Sun Y, Oberley LW, Li YA. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497-500.
- 78- Durak I, Yurtaslani Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chem Acta* 1993, 214: 103-4.
- 79- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal In Packer L. *Methods Enzymol* 1990, 16: 407-21.
- 80- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis. Academic press: New York and London* 1974, 673-7.

- 81- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-75.
- 82- Hodyl NA, Krivanek KM, Lawrence E, Clifton VL, Hodgson DM. Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *Journal of Neuroimmunology* 2007, 190: 61–71.
- 83- Chen K, Geng S, Yuan R, Diao N, Upchurch Z, Li L. Super-low dose endotoxin pre-conditioning exacerbates sepsis mortality. *Ebio Med* 2015, 2(4): 324-33.
- 84- Wei YL, Li XH, Zhou JZ. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28 (5): 651–6.
- 85- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 2007, 56: 1761–72.
- 86- Zhao R, Zhau H, Su BS. A critical role for interleukin-1B in the progression of autoimmune diseases. *International immunopharmacology* 2013, 17: 658-69.
- 87- Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ. The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem. J.* 1986, 235: 329-36.
- 88- Chen Y, Du Y, Li Y, Wang X, Gao P, Yang G. Panaxadiol Saponin and Dexamethasone Improve Renal Function in Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model of Acute Kidney Injury. *PLoS ONE* 2015, 10(7): e0134653.
- 89- Khodir AE, Ghoneim HA, Rahim MA, Suddek GM. Montelukast attenuates lipopolysaccharide-induced cardiac injury in rats. *Hum Exp Toxicol* 2015 doi 10.1177.
- 90- Kao SJ, Wang D, Lin HI, Chen HI. N-Acetylcysteine Abrogates Acute Lung Injury Induced By Endotoxin. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology* 2006, 33: 33–40.
- 91- Doursout MF, Schurdell MS, Young LM, Osuagwu U, Hook DM, Poindexter BJ, Schiess MC, Bick DLM, Bick RJ. Inflammatory Cells and Cytokines in the Olfactory Bulb of a Rat Model of Neuroinflammation; Insights into Neurodegeneration. *Journal Of Interferon & Cytokine Research* 2013, 33: 376-83.

- 92- Zager A, Pinheiro ML, Paula VF, Ribeiro A, Neto JP. Increased cell-mediated immunity in male mice offspring exposed to maternal immune activation during late gestation. *International Immunopharmacology* 2013, 17: 633–7.
- 93- Von Dadelszen P, Watson RWG, Noorwali F. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 181: 408–14.
- 94- Luo D, Schowengerdt KO, Stegner JJ. Decreased functional caspase-3 expression in umbilical cord blood neutrophils is linked to delayed apoptosis. *Pediatr Res* 2003, 53: 859–64.
- 95- Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005, 11: 5–11.
- 96- Kramer BW, Kallapur SG, Moss TJM, Nitsos I, Polglase GP, Newnham JP, Jobe AH. Modulation of fetal inflammatory response upon exposure to LPS by chorioamnion, lung or gut in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2010, 202: 771–9.
- 97- Bernardi MM, Teixeira LP, Oliveira APL, Lima WT, Neto JP, Kirsten TB. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces sexually dimorphic sickness behavior in adult rats. *Psychology & Neuroscience* 2014, 7: 113 – 23.
- 98- Solati J, Kleehaupt E, Kratz O, Moll GH, Goluba Y. Inverse effects of lipopolysaccharides on anxiety in pregnant mice and their offspring. *Physiology & Behavior* 2015, 139: 369–74.
- 99- Tamion F, Bauer F, Richard V, Laude K, Renet S, Slama M, Thuillez C. Myocardial Dysfunction in Early State of Endotoxemia Role of Heme-Oxygenase-1. *Journal of Surgical Research* 2010, 158: 94–103.
- 100- Sebai H, Sani M, Aouani E, Boughanmi NG. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug and Chemical Toxicology* 2011, 34: 146-50.
- 101- Shaul VB, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicology Letters* 2001, 123: 1–10.
- 102- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M. Mechanisms and

functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int* 2013, 33: 283–93.

103-Sebai H, Sani M, Boughanmi NG, Aouani E. Prevention of lipopolysaccharide-induced mouse lethality by resveratrol. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48: 1543–9.

104-Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Boughanmi NG, Attia MB. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010, 73: 1078–83.

105-Ajuwon OR, Oguntibeju OO, Marnewick JL. Amelioration of lipopolysaccharide-induced liver injury by aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract via inhibition of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14: 392–404.

EKLER

EK.1

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Malatya’da doğdu. Ortaöğretim ve lise eğitimini Malatya’da tamamladı. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Sağlık Memurluğu bölümünden mezun oldu. 2009-2011 yıllarında Hemşirelik yaptıktan sonra 2012 yılında Atatürk Üniversitesinde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı, 2013 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak atandı, Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini bitirip, 2015 yılında Doktora eğitimine başladı. 2010 yılında başlamış olduğu Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansı devam etmektedir. Evli, bir çocuk sahibi ve orta derecede İngilizce bilmektedir.

EK.2. ETİK ONAY FORMU



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 07-07-2011
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokolü no.su : 2011/A-66
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 15 adet adet dişı Wistar-Albino sıçanın 40
adet erkek yavrusu
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : Erişkin dişiler ve erkek yavruları

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Sedat YILDIZ'ın yürüttüğü "Fetal ve pubertal dönemde endotoksin uygulanan erkek sıçanlarda enflamatuvar ve oksidatif parametrelerin incelenmesi" isimli 2011/A-66 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç. Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye Katılmadı
 Prof. Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof. Dr. Selim DOĞANAY Üye Katılmadı	 Yrd. Doç. Dr. Marif ALADAĞ Üye
 Vet. Hekim Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye Katılmadı	



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi

Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : B.30.2.İNÜ.0.20.05.05/17

Konu : 2011/A-66 nolu çalışma

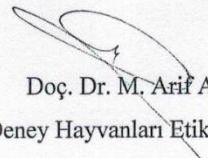
MALATYA

04 / 08 / 2014

Sayın: Prof. Dr. Sedat YILDIZ
Fizyoloji AD

2011-/A-66 protokol nolu “**Fetal ve pubertal dönemde endotoksin uygulanan erkek sıçanlarda enflamatuvar ve oksidatif parametrelerin incelenmesi**” isimli projenizde yeterince erkek yavru sıçan bulunamadığından dolayı çalışmanın dişi sıçanlar üzerinde yapılması ve başlığının “**Fetal ve pubertal dönemde endotoksin maruziyetinin dişi sıçanlarda enflamatuvar ve oksidatif parametreler üzerine etkisi**” şeklinde değiştirilmesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı