



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KANNABİDİOLÜN GEBELİKTE LİPOLİSAKKARİT İLE
İNDÜKLENEN SİSTEMİK İNFLAMASYON MODELİNDE
NÖROİNFLAMASYON VE NÖROGENEZ ÜZERİNE ETKİSİ**

Deniz ÇATAKLI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serdar SEZER

II. DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-8396 nolu proje ile
desteklenmektedir.**

ISPARTA – 2023

KABUL ve ONAY SAYFASI

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/06/2023

Danışman : Prof. Dr. Serdar SEZER
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi-Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Halil AŞCI
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi-Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Mehtap SAVRAN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Faköltesi-Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER
Ege Üniversitesi
Eczacılık Faköltesi-Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Hemşirelik Bölümü-Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Enstitü Müdürü

BEYAN

“Kannabidiolün Gebelikte Lipopolisakkarit ile İndüklenen Sistemik İnflamasyon Modelinde Nöroinflamasyon ve Nörogenез Üzerine Etkisi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hazırlayan

Deniz ÇATAKLI

Danışman

Prof. Dr. Serdar SEZER

II. Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında, kannabidiolün gebelikte lipopolisakkarit ile indüklenen sistemik inflamasyon modelinde fetal nöroinflamasyon ve nörogenez süreci üzerine etkisi araştırılmıştır. İnflamasyon sonucu aktive olan NF- κ B sinyal mekanizması ve bunun sonucunda artan pro-inflamatuar sitokin düzeylerinin kannabidiol uygulamasıyla baskılandığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, nöroinflamasyon sonucu aktive olan astrositlerin önemli belirteçleri olan GFAP ve S100B proteinlerinin ifade düzeylerinin kannabidiol uygulamasıyla azaldığı ortaya konulmuştur. Bununla beraber önemli bir transkripsiyon faktörü olan ve nöronal sağkalım, plastisite, öğrenme-bellek gibi fizyolojik süreçlerde rolü olan CREB düzeyinde inflamasyona bağlı olarak meydana gelen artışın kannabidiol uygulamasıyla baskılandığı belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, kannabidiolün gebelikte inflamasyon sonucu fetal beyinde ortaya çıkan nöroinflamasyon sürecinde anti-inflamatuar etkisi olabileceğini ve nörogenez sürecini olumlu yönde etkileyebileceğini önermektedir.

Bu çalışma TDK-2021-8396 proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca ilgi, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, bilimsel anlamda ilerlememe katkı sağlayan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, tez sürecimi birlikte yürüttüğüm, çalışmaktan büyük onur duyduğum danışman hocalarım Prof. Dr. Serdar SEZER ve Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU'ya,

Tez çalışmamın planlanmasında tecrübeleri ve değerli bilgileriyle katkı sağlayan Doç. Dr. Halil AŞCI ve Doç. Dr. Mehtap SAVRAN'a,

Doktora sürecime danışmanlığında başladığım ve ilerleyen süreçte desteğini benden esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER'e,

Bilgi ve tecrübeleri ile tez çalışmama katkıda bulunan, Dr. Öğr. Üyesi Onur ERTUNÇ'a,

Tez sürecimde *in vivo* çalışmalarda yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Uzm. Hatice Kübra DOĞAN, Dr. Samet COŞAN, Dr. Yavuz Selim SEVİNÇ ve Uzm. Esra AYDOĞDU'ya,

Analizlerimde teknik bilgi ve deneyimleriyle katkıları olan Süleyman Demirel Üniversitesi Doğal Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUDUM)'nin değerli çalışanları Öğr. Gör. Taner ERKAYMAZ ve Öğr. Gör. Oğuz SÖĞÜT'e,

Hayatım boyunca beni destekleyen, evlatları olmaktan gurur duyduğum, sevgi ve şefkatlerini her zaman hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez projem 'Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK- 2021-8396) ' tarafından desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasında yer alan Şekil 2.1. ve 2.2. olarak numaralandırılmış şekillerin kaynak gösterildiği makalelerden alınarak Türkçeleştirilmiş halde tekrar çizilmesi işleminde BioRender isimli uygulamanın 'eğitim amaçlı' ücretsiz planından faydalanılmıştır.

ÖZET

Kannabidiolün Gebelikte Lipopolisakkarit ile İndüklenen Sistemik İnflamasyon Modelinde Nöroinflamasyon ve Nörogenez Üzerine Etkisi

Dünya genelinde her yıl 15 milyon gebeliği etkilediği bilinen preterm doğum, önemli bir yenidoğan ölüm sebebidir. Bununla birlikte, hayatta kalan bebeklerde gelişebilecek olan nörogelişimsel, kardiyometabolik ve inflamatuvar bozukluklar için ciddi risk faktörü olduğu bilinmektedir. Koryoamniyonit, ikiz gebelikler, genetik faktörler, uterus anomalileri preterm doğum için bilinen risk faktörleri olmakla birlikte, gebelikte gelişen inflamasyonun da önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur. Vücudun bağışıklık sisteminin koruyucu yanıtı olarak tanımlanan bir mekanizma olan inflamasyon sürecinde inflamatuvar yanıtta oluşan kusurlar doku hasarı, kronik inflamasyon, oto-immünite gibi durumlara yol açabilmektedir. Bunlarla birlikte gebelik sürecinde de önemli bir risk faktörü olan ve fetal nöroinflamasyon ve nörogenez sürecini etkileyebilen çeşitli komplikasyonlara yol açabilen inflamasyonun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına olan ihtiyaç devam etmektedir.

Fetal nörogelişimsel süreci etkileyen ve serebral palsi, otizm spektrum bozukluğu gibi durumlarla sonuçlanması mümkün olan preterm doğum ve benzeri durumları önlemek amacıyla magnezyum sülfat, folik asit, melatonin ve N-asetil-L-sistein gibi ajanlar kullanılmaktadır. Fakat mevcut ajanların direkt olarak fetal nöroprotektif etkileri olup olmadıkları konusunda tartışmalar ve yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesine olan ihtiyaç devam etmektedir. Cannabaceae familyasına ait olan ve uzun zamandır tıbbi amaçlarla yaygın olarak kullanılan *Cannabis sativa* (Hint keneviri)'da 120'den fazla fitokannabinoid keşfedilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak bulunan fitokannabinoidlerden biri kannabidiol (CBD)'dür. Günümüzde ticari olarak geliştirilen Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı CBD içeren preparatlar Dravet sendromu ve Lennox-Gastaut sendromu ile ilişkili nöbetlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında plasental bariyeri kolayca geçebildiği ve anti-inflamatuvar etkisi bilinen CBD'nin, gebelikte sistemik inflamasyon modelinde fetal nöroinflamasyon ve nörogenez sürecine olan etkisi araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: İnflamasyon, Kannabidiol, Nörogenez, Nöroinflamasyon, Preterm doğum.

ABSTRACT

The Effect of Cannabidiol on Neuroinflammation and Neurogenesis in the Lipopolysaccharide-induced Systemic Inflammation Model in Pregnancy

Preterm birth, which is known to affect 15 million pregnancies worldwide each year, is an important cause of neonatal death. Besides that, it is known to be a serious risk factor for neurodevelopmental, cardiometabolic and inflammatory disorders that may develop in surviving infants. Although chorioamnionitis, twin pregnancies, genetic factors and uterine anomalies are known risk factors for preterm birth, inflammation during pregnancy has also been shown to be an important risk factor. In the process of inflammation, which is a mechanism defined as the protective response of the body's immune system, defects in the inflammatory response can lead to conditions such as tissue damage, chronic inflammation and auto-immunity. In addition, there is an ongoing need to elucidate the molecular mechanism of inflammation, which is an important risk factor in pregnancy and can lead to various complications that can affect fetal neuroinflammation and neurogenesis.

Therapeutic agents, including magnesium sulfate, folic acid, melatonin and N-acetyl-L-cysteine, are used to prevent preterm birth and similar conditions that affect the fetal neurodevelopmental process and can result in conditions such as cerebral palsy and autism spectrum disorders. However, there remains controversy about whether existing agents have direct fetal neuroprotective effects and there is a continuing need to develop new therapeutic targets. More than 120 phytocannabinoids have been discovered in *Cannabis sativa* (Indian hemp), which belongs to the Cannabaceaceae family and has long been widely used for medicinal purposes. One of the most widely available phytocannabinoids is cannabidiol (CBD). Currently, commercially developed Food and Drug Administration (FDA)-approved CBD-containing preparations are used to treat seizures-associated with Dravet syndrome and Lennox-Gastaut syndrome. In this thesis, the effect of CBD, which can easily cross the placental barrier and is known to have anti-inflammatory effects, on fetal neuroinflammation and neurogenesis in a systemic inflammation model during pregnancy was investigated.

Key words: Cannabidiol, Inflammation, Neurogenesis, Neuroinflammation, Preterm birth.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Preterm Eylem.....	3
2.1.1. Preterm Eylem ve Fetal Beyin Hasarı	4
2.2. Gebelikte Nöroinflamasyon Mekanizmaları	5
2.2.1. Fetal Nörogenez ve Oluşum Mekanizmaları	7
2.2.2. Nöroinflamasyon ve Nörogenez İlişkisi	12
2.3. Fetal Nöroprotektif Terapötik Ajanlar	14
2.3.1. Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	14
2.3.2. Folik Asit	15
2.3.3. Melatonin.....	15
2.3.4. N-Asetil Sistein	16
2.4. Kannabinoidler	17
2.4.1. Endokannabinoidler.....	18
2.4.2. Kannabidiol (CBD)	19
2.4.2.1. CBD ve Nöroinflamasyon.....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	21
3.1. Cihazlar	21
3.2. Sarf Malzemeleri	22
3.2.1. Kitler.....	22

3.2.2. Kimyasallar.....	22
3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	23
3.3.1. 2X RIPA (Radyoimmünopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu	23
3.3.2. 10X PBS (Phosphate Buffer Saline).....	23
3.3.3. 10X Transfer Tamponu	23
3.3.4. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu.....	24
3.3.5. 4X SDS-PAGE Ayırma Tamponu (Resolving Buffer)	24
3.3.6. 4X SDS-PAGE Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer).....	24
3.3.7. 4X Protein Yükleme Tamponu.....	24
3.3.8. 1X Yıkama Tamponu	24
3.3.9. %10 AP (Amonyum Persülfat) Çözeltisi	24
3.3.10. %5'lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı	25
3.4. Yöntem	25
3.4.1. Deney Hayvanları	25
3.4.2. Vajinal Smear Örneklerinin Alınması ve İncelenmesi	29
3.4.3. Kannabidiol ve Lipopolisakkarit Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması	31
3.4.4. Histerotomi ve Sakrifikasyon	32
3.4.5. Dokuların Homojenizasyonu.....	34
3.4.6. LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi) Analizi	35
3.4.6.1. CBD Analizi İçin Ekstraksiyon Metodu	35
3.4.6.2. Cihaz Bilgileri	36
3.4.6.3. Kullanılan Mobil Fazlar	36
3.4.7. İmmünoblotlama (Western Blot).....	37
3.4.7.1 Total Protein İzolasyonu ve BCA Analizi	37
3.4.7.2. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE). 38	
3.4.7.3. Ayırıştırılan Proteinlerin Membrana Transferi	40
3.4.7.4. Membrana Transfer Edilen Protein Örneklerinin Görüntülenmesi.....	41
3.4.7.5. Bloklama ve Primer Antikor ile İşaretleme	41
3.4.7.6. Sekonder Antikor ile İşaretleme	42
3.4.7.7. Kemilüminesans Görüntüleme.....	42
3.4.8. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	42
3.4.9. Histokimyasal Yöntemler	44

3.4.9.1. Fetal Beyin ve Plasenta Dokularında Hematoksilen-Eozin Boyama..	45
3.4.10. İmmünohistokimyasal Yöntemler	46
4. BULGULAR	48
4.1. Fetal Beyin ve Plasenta Dokularında CBD Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	48
4.2. İmmünoablottama ile p(Ser536)-NF- κ B, NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB Proteinlerinin İfade Düzeylerinin Fetal Beyin Dokusunda Belirlenmesi	55
4.3. Fetal Beyin Dokularında IL-1 β Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	60
4.4. Histopatolojik İncelemeler ve İmmünohistokimyasal Bulgular.....	62
4.4.1. Fetal Beyin Dokularındaki Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları	62
4.4.2. Plasenta Dokularında Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları.....	68
4.4.3. Fetal Beyin Dokularında TNF- α İmmün Boyama Bulguları.....	75
4.4.4. Plasenta Dokularında TNF- α İmmün Boyama Bulguları.....	79
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ.....	119

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Deney grupları ve ajan uygulama planı.	27
Tablo 3.2. Tüm gruplara ait ratların ölçülen ağırlıkları.	29
Tablo 3.3. LC-MS/MS işleminde kullanılan kolona ait bilgiler ve analiz parametreleri.	36
Tablo 3.4. Cihazın SRM (selected reaction monitoring) bilgisi.	37
Tablo 3.5. SDS-PAGE ayırma ve yığınlama jellerinin hazırlanması.	39
Tablo 3.6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.	42
Tablo 3.7. Skorumlama tablosu.	47
Tablo 4.1. Fetal beyin dokularında LC-MS/MS cihazı ile ölçülen CBD miktarları.	49
Tablo 4.2. Plasenta dokularında LC-MS/MS cihazı ile ölçülen CBD miktarları.	50
Tablo 4.3. Fetal beyin dokularında kontrol, LPS, LPS+ CBD 5mg/kg, LPS+ CBD 10mg/kg ve LPS+ CBD 30mg/kg gruplarında saptanan ortalama CBD konsantrasyonları, $\pm$ SEM ve <i>p</i> değerlerine ilişkin değerler.	54
Tablo 4.4. Plasenta dokularında kontrol, LPS, LPS+ CBD 5mg/kg, LPS+ CBD 10mg/kg ve LPS+ CBD 30mg/kg gruplarında saptanan ortalama CBD konsantrasyonları, $\pm$ SEM ve <i>p</i> değerlerine ilişkin değerler.	55
Tablo 4.5. Fetal beyin dokularında kontrol, LPS, LPS+ CBD 5mg/kg, LPS+ CBD 10mg/kg ve LPS+ CBD 30mg/kg gruplarında belirlenen p(Ser536)-NF- κ B, NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB protein kat artışlarının ortalama, $\pm$ SEM ve <i>p</i> değerlerine ilişkin değerler.	57
Tablo 4.6. Standartlara ait konsantrasyonlar ve O.D. değerleri.	60
Tablo 4.7. Fetal beyin dokularında deney gruplarına ait her gruptan bağımsız 3 örneğe ilişkin ortalama O.D. değerleri ve IL-1 β konsantrasyonları.	61
Tablo 4.8. Fetal beyin dokularında konjesyon&hemoraji, ödem ve meninkslerde kanama bulgularının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri.	63
Tablo 4.9. Fetal beyin dokularında konjesyon&hemoraji, ödem ve meninkslerde kanama bulgularının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri.	65
Tablo 4.10. Plasenta dokularında bazal zon ve labirent zona ait histopatolojik bulguların gruplara göre skorumlanması.	70
Tablo 4.11. Plasenta dokularında histopatoloji parametrelerinin skorlarının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri.	71
Tablo 4.12. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama bulgularının gruplara göre skorumlanması.	76
Tablo 4.13. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama skorlarının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri.	77

Tablo 4.14. Plasenta dokularında TNF- α immün boyama bulgularının gruplara göre skorlanması.	80
Tablo 4.15. Plasenta dokularında TNF- α immün boyama skorlarının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri.	81



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. LPS indüksiyonu sonucu gerçekleşen fetal beyin hasarı ve oluşum mekanizmaları.	14
Şekil 2.2. Kannabinoidlerin sınıflandırılması.	18
Şekil 2.3. CBD'nin kimyasal yapısı.	19
Şekil 4.1. LC-MS/MS cihazına ilişkin veri çıktısı.	51
Şekil 4.2. Fetal beyin dokularına ait CBD spektrumları.	52
Şekil 4.3. Plasenta dokularına ait CBD spektrumları.	53
Şekil 4.4. LC-MS/MS ölçümü sonucunda, kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına fetal beyin ve plasenta dokularında saptanan CBD konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi.	54
Şekil 4.5. Kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına ait fetal beyin dokularında p(Ser536)-NF-κB, NF-κB, GFAP, S100B ve CREB protein düzeylerinin immünoiblota ile incelenmesi.	56
Şekil 4.6. Fetal beyin dokularında p(Ser536)-NF-κB, NF-κB, GFAP, S100B ve CREB protein ifadelerindeki değişimlerin kat artışı cinsinden grafiksel gösterimi.	59
Şekil 4.7. Standart eğrisi.	61
Şekil 4.8. Deney gruplarına ait IL-1β konsantrasyonlarının (pg/ml) grafiksel gösterimi.	62
Şekil 4.9. Fetal beyin dokularında hematoksilen-eozin boyamalarına ait skorların grafiksel gösterimi.	68
Şekil 4.10. Plasenta dokularında hematoksilen-eozin boyamalarına ait bazal zon bulguları skorlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.	74
Şekil 4.11. Plasenta dokularında hematoksilen-eozin boyamalarına ait labirent zon bulguları skorlarının istatistiksel olarak değerlendirmesi.	74
Şekil 4.12. Fetal beyin dokularında TNF-α immün boyamalarına ait grup skorlarının grafiksel gösterimi.	79
Şekil 4.13. Plasenta dokularında TNF-α immün boyamalarına ait grup skorlarının grafiksel gösterimi.	83

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Gebelik modelinin indüksiyonu amacıyla 2 dişi ve 1 erkek ratın kafeslerde barındırılması.	28
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan bir ratın ağırlığının ölçülmesi.	29
Resim 3.3. Vajinal smear örneklerinin alınması.	30
Resim 3.4. Alınan örneklerin Pap smear boyama sonrası lam tepsisine yerleştirilmesi ve numaralandırılması.	30
Resim 3.5. Pap smear boyama sonucu incelenen örneklerin mikroskopik görüntüsü. Oklar preperatta gözlenen spermleri gösterir.	31
Resim 3.6. Ajanların ratlara i.p. olarak uygulanması.	32
Resim 3.7. <i>Vena cava inferiordan</i> kan alımı.	32
Resim 3.8. Histerotomi işlemi ile alınan fetüsler.	33
Resim 3.9. Fetal beyin ve plasenta dokularının ayrılması.	33
Resim 3.10. Formaldehit içeren steril kaplara yerleştirilen fetal beyin ve plasenta örnekleri.	34
Resim 3.11. Dokulara soğuk a) PBS eklenerek homojenize edilmesi, b) sonikasyon işlemi, c) santrifüj işlemi ile süpernatantın ayrıştırılması, d) süpernatant toplanması.	35
Resim 3.12. Kullanılan LC-MS/MS cihazın görünümü.	37
Resim 3.13. Dokulardan izole edilen protein örneklerinin BCA yöntemi ile total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi.	38
Resim 3.14. a) SDS-PAGE jelinin hazırlanması, b) protein örneklerinin jele yüklenmesi, c) elektroforez işleminin uygulanması.	40
Resim 3.15. PVDF membranına transfer olan proteinlerin Ponceau-S-staining solüsyonu ile boyanması.	41
Resim 3.16. a) Standartların ve örneklerin kuyucuklara yüklenmesi, b) ELISA plate'inin inkübe edilmesi, c) standartlara ait görüntüler.	44
Resim 4.1. Fetal beyin dokularındaki histopatolojik bulgular.	67
Resim 4.2. Plasenta dokularının histopatolojik değerlendirmesi.	73
Resim 4.3. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyamalarına ait görüntüler. ...	78
Resim 4.4. Plasenta dokularında TNF- α boyamalarına ait görüntüler.	82

KISALTMALAR DİZİNİ

Δ^9-THC	: Δ^9 -tetrahidrakannabinol
2-AG	: 2-araşidonoil-gliserol
5-HT1A	: Serotonin 1A
AEA	: Anandamit
CBD	: Kannabidiol
CBG	: Kannabigerol
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CREB	: cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein
DAMP	: Hasarla ilişkili moleküler paternler
EG	: Embriyonik gün
EMR	: Erken membran rüptürü
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
IFN-γ	: İnterferon gamma
iNOS	: Nitrik oksit sentaz
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
MİA	: Maternal immün aktivasyon
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NAC	: N-asetil-L-sistein
NF-κB	: Nükleer faktör kabba B
NMDA	: N-metil-D-aspartat
PD	: Preterm doğum

PE	: Preterm eylem
Poli(I:C)	: Poliinosinik: polisitidilik asit
PPAR	: Peroksizom Proliferatör-Aktivate Reseptörler
PPR	: Kalıp tanıma reseptörleri
SF	: Serum fizyolojik
SSS	: Santral sinir sistemi
TF	: Transkripsiyon faktörü
THC	: Tetrahidrokannabinol
TLR	: Toll-benzeri reseptörler
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TNFR	: Tümör nekrozis faktör reseptörü
TRPV	: Transient Reseptör Potansiyel Kanalları

1. GİRİŞ

Preterm doğum (PD), gebeliğin 37. haftasından önce gerçekleşen doğum olarak tanımlanmaktadır ve her yıl dünya genelinde 15 milyon gebeliği etkilediği bilinmektedir (1,2). Önemli bir yenidoğan ölüm sebebi olmakla birlikte, hayatta kalan bebeklerin yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde enfeksiyon, nörogelişimsel, kardiyometabolik ve inflamatuvar bozukluklar gibi ciddi durumlarda için risk faktörü olmaktadır (3-6). İkiz gebelikler, koryoamniyonit, annede varolan kronik hastalıklar, genetik faktörler, uterus anomalileri PD için önemli risk faktörleridir (7). Bunların yanı sıra inflamasyonun da PD için önemli bir risk faktörü olduğu ve doğum eyleminin fizyolojik başlangıcında tetikleyici rolü olduğu bilinmektedir (7).

İnflamasyon, vücudun bağışıklık sisteminin ilk koruyucu tepkisi olarak nitelendirilen oldukça dinamik bir süreçtir. Vücudun, mikrobial istilalara, antijenlerin girişine, hücre ve dokuların herhangi bir yaralanma veya hasara karşı korunma mekanizmasıdır. İnflamasyon süreci çözünebilir mediyatörlerin, yerleşik hücrelerin yanı sıra ekstrasellüler matrikse ait sızan hücrelerin ve moleküllerin karmaşık etkileşimlerini içerir. Hücre için yararlı ve kontrollü bir inflamatuvar yanıt, zararlı uyarıların uzaklaştırılmasına ve kompleks bir moleküler sinyal mekanizması tarafından doğru şekilde düzenlenen fizyolojik süreçlerin geri kazanılmasını sağlar. Fakat inflamatuvar yanıtın kusurlu olması morbiditeyle sonuçlanabilen ve birçok hastalığın patofizyolojisinde yer alan kronik inflamasyon, otoimmünite, doku hasarı gibi durumlara yol açabilir (8). Gebelikte de önemli bir risk faktörü olan ve çeşitli komplikasyonlara yol açabilen inflamasyonun moleküler mekanizmalarının araştırılmasına olan ihtiyaç devam etmektedir.

Nükleer faktör kabba B (NF- κ B) transkripsiyon faktörü, doğal ve adaptif immün süreçlerde inflamatuvar yanıtların mediyatörü olarak görev yapmaktadır. NF- κ B, sitokinleri ve kemokinleri kodlayanlar da dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuvar genlerin ifadesini indüklemektedir. Bununla birlikte, NF- κ B doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin ve inflamatuvar T hücrelerinin hayatta kalması, aktivasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Fakat, düzensiz NF- κ B aktivasyonu çeşitli inflamatuvar hastalıkların patojenik süreçlerinin ortaya çıkmasına neden olur (9).

Lipopolisakkarit (LPS), *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan, konsantrasyonu ve süresi oluşturulmak istenilen inflamasyon modeline göre değişebilen bakteriyel endotoksindir ve NF- κ B aracılı sinyal mekanizmasının önemli bir uyararı olduğu bilinmektedir (10). Gebelikte koryoamniyonit modeli de dahil olmak üzere *in vivo* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (11,12).

Gebelikte gelişmesi mümkün olan inflamasyon durumunda yol açabileceği PD ve buna bağlı olarak gelişebilecek olan serebral palsy, otizm spektrum bozukluğu gibi durumları önlemek amacıyla magnezyum sülfat (MgSO₄), folik asit, melatonin ve N-asetil sistein gibi nöroprotektif ajanlar kullanılmaktadır (13-16). Fakat literatürde bu moleküllerin fetal beyin üzerinde direkt olarak nöroprotektif bir etkisi olup olmadığına ve erken doğum riski olanlarda kullanımlarının güvenilirliği konusunda tartışmalar devam etmektedir. Bu nedenle, PD ve bununla ilişkili fetal nöroprotektif etkisi olan güvenilir moleküllere olan ihtiyaç devam etmektedir.

Cannabaceae familyasına ait olan *Cannabis sativa* (Hint kenevir) ve ikincil metabolitleri uzun zamandır tıbbi ve psikoaktif amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (17). Bugüne kadar *C.sativa*'da 120'den fazla fitokannabinoid keşfedilmiştir. En yaygın olarak bulunan iki fitokannabinoid olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) ve kannabidiol (CBD)'dir (18). Ticari olarak geliştirilen CBD içeren formülasyonlar Dravet sendromu ve Lennox-Gastaut sendromu ile ilişkili nöbetlerin tedavisinde kullanılmaktadır (19). Plasenta bariyerini kolayca geçebildiği ve anti-inflamatuar etkisi bilinen CBD'nin gebelikte görülen inflamasyona bağlı olarak fetal beyinde gelişen ve birçok hastalığın patolojisinde yer alan nöroinflamasyon ve nörogenez sürecine olan etkisi daha önce araştırılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında anti-inflamatuar etkisini bilinen CBD'nin gebelikte LPS ile indüklenen sistemik inflamasyon modelinde fetal beyinde nöroinflamasyon ve nörogenez süreci üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Preterm Eylem

Preterm eylem (PE), term gebelikten önce (20 ile 37 hafta arası) servikal dilatasyon ve efasma neden olan yeterli sıklıkta ve güçte uterus kasılmalarının varlığına bağlı olarak gelişen durumdur (20).

Membran rüptürü (MR) doğumdan önce meydana gelen doğal bir fizyolojik durumdur, fakat gebeliğin 37. haftasından önce meydana geldiğinde, erken membran rüptürü (EMR) olarak adlandırılır (21). Birçok klinik ve epidemiolojik faktör EMR'e sebep olabilir (21,22).

PE ve EMR, dünyadaki gebeliklerin yaklaşık olarak %11'ini etkileyen başlıca komplikasyonlardır (4). PE ve EMR, genetik, ırk/etnik köken, aile öyküsü, sosyo-ekonomik durum ve coğrafi konum gibi çeşitli risk faktörlerine bağlı olarak meydana gelebilir ve gebelik sürecini etkileyebilir (24,25). Bunlarla beraber, gebelik sırasında karşılaşılabilen maternal ve intraamniyotik enfeksiyonlar, inflamasyon, vasküler ve endokrin disfonksiyon gibi risk faktörleri, gebelik sırasında PE ve EMR'e yol açabilen biyokimyasal ve/veya biyomekanik süreçleri oluşturabilmektedir (24,26). Maternal ve fetal enfeksiyonlara karşı gelişen konakçı inflamatuvar yanıtları, PE'nin ~ %50'si ve EMR'nin %70'i ile ilişkilendirilmiştir (24,25). Enfeksiyon ve konakçı inflamatuvar yanıtların aynı zamanda preterm yenidoğanlarda çeşitli morbiditelere yol açtığı bilinmektedir (7,27). Maternal patofizyoloji, plasenta filtresi aracılığıyla fetal fizyolojiyi etkilemektedir. İnflamasyon sonucu ifade edilen sitokinlerin doğrudan plasenta-kan bariyerini geçip fetal inflamatuvar yanıtı dolaylı yoldan tetikleyip tetiklemediği tam olarak anlaşılmış olmasa da (28) gelişmekte olan fetal beyinin nörolojik olarak etkilenme potansiyeline sahip immünolojik sinyallere duyarlı olduğu bilinmektedir (29,30).

PE aynı zamanda yenidoğanda uzun süreli nörolojik bozukluklara yol açabilen önemli bir risk faktörüdür (31,32). Serebral palsi, periventriküler lökomalazi, otizm spektrumu bozukluğu, enfeksiyon ve enfeksiyonla ilişkili konakçı inflamatuvar yanıtlarıyla bağlantılı olduğu bilinmektedir (33-36). Bu risk faktörlerinin altında yatan mekanizmayı ve bunların feto-maternal dokularla etkileşimlerini

anlamak, PE ve EMR insidansını ve bununla ilişkili morbiditeleri azaltmak için kritik öneme sahiptir.

2.1.1. Preterm Eylem ve Fetal Beyin Hasarı

Santral sinir sistemi (SSS), sınırlı rejeneratif kapasiteye sahiptir ve bağışıklık sisteminin SSS'ye etkisi oldukça fazladır (37). Bağışıklık sisteminin zarar görmesine yol açan inflamasyon durumu sonucunda hem periferik hem santral immün yanıtlar prenatal periyot boyunca SSS'de inflamatuvar süreçlerin indüksiyonuna yol açabilmektedir. Bu süreçte, immatür beyin SSS'nin, fetal ve neonatal yaşam sırasında uzun süreli sonuçları ve beyin gelişiminin kritik aşamalarını etkileyen bağışıklık sisteminin aktivasyonu gibi birkaç temel aşamasından geçer (38,39).

Perinatal dönemde gerçekleşen beyin hasarı neonatal ensefalopati, neonatal inme, hipoksik iskemik ensefalopati gibi çeşitli klinik durumlara yol açabilir. Özellikle gebelik sürecinde ortaya çıkan sistemik inflamasyonun, fetal ve postnatal dönemi etkileyen inflamatuvar süreç sonucu gelişen ensefalopatilerde önemli etkisi olduğu bilinmektedir. Perinatal hasarlar immün sistemin aktivasyonuna bağlı olarak, sitokinler ve kemokinler gibi immün mediyatörlerin, reaktif oksijen türevleri (ROS), reaktif nitrozatif türevleri, eksitotoksisite, mitokondriyal hasar ve vasküler bütünlük gibi periferik ve santral yanıtların oluşmasına neden olabilmektedir.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin kalıp tanıma reseptörleri (PPR), organizmaya yabancı antijenleri ayırt etmek, istilacı virüs ve mikroplara karşı hücresel savunma mekanizması oluşmasını sağlar. Bu reseptörler, hasarlı dokulardan ifade edilen endojen moleküller gibi farklı patojen sınıflarını tanıyabilir, enfeksiyon kaynaklı yaralanmalarda hem de hipoksik-iskemik ya da neonatal inme sonucu gelişen inflamatuvar yanıtlarda rol oynayabilirler. Toll-like reseptör (TLR) ailesi gelişmekte olan beyinde en fazla çalışılan PPR olmuştur.

Enfeksiyon ve inflamasyon, erken doğumun yaygın nedenleridir ve prematüre beyin hasarıyla bağlantılıdır. Artan enfeksiyon ve bununla ilişkili inflamasyonun erken doğuma neden olmasının yanı sıra, koryoamniyonit membranlardan amniyotik sıvının fetal dolaşıma ulaşmasına neden olarak sistemik fetal inflamasyon oluşumuna sebep olabilir. Bu sistemik inflamasyon, beyin de dahil olmak üzere birçok organı

etkileyebilir. Yapılan çalışmalarda erken doğum eylemi gerçekleşen annelerin amniyotik sıvılarında artan interlökin (IL)-6 ve IL-8 konsantrasyonlarına sahip olduğu bulunmuştur (40).

Epidemiyolojik çalışmalar, göbek kordonunda, amniyotik sıvıda ve fetal kanda yüksek sitokin seviyeleri ile serebral palsi ve gelişim bozukluklarını ilişkilendirmiştir. En yaygın olarak gözlemlenen sitokinler arasında tümör nekrozis faktörü-alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), IL-1, IL-6 ve IL-18 yer almaktadır (40-42).

2.2. Gebelikte Nöroinflamasyon Mekanizmaları

İnflamasyon, hücrel-çevresel sinyal mekanizmasında önemli bir rol oynar ve ortaya çıkan hücrel tepkiler iyi bir şekilde ayarlanmış epigenetik mekanizmalar aracılığıyla düzenlenir. Yaşam boyu karşılaşılan çevresel faktörler, bireyin epigenetik yapısında, spesifik ve uzun süreli etkilere sebep olabilir.

Gebelik sırasında, annenin maruz kaldığı çevresel faktörlerin yavruların bağışıklık ve gelişimsel epigenetik koduna programlandığı varsayılmaktadır, bu sebeple sonraki yaşamlarında nörogelişimsel bozukluklara karşı hassasiyetlerini etkileyebilmektedir (43,44). Maternal immün aktivasyon (MIA) hipotezi, uterus ortamında maternal bağışıklık sisteminin düzensizliğinin fetal nörogelişimi etkilediğini savunmaktadır (45,46).

Deney hayvanı modellerinde yapılan çalışmalar, annenin bağışıklık sisteminin patojen veya risk faktörlerinden bağımsız olarak da nörogelişimsel bozukluklara neden olabileceğini göstermiştir (45).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise kemirgen modellerinde, gebelik süresinde annede influenza enfeksiyonu gelişmesi sonucu yavruda, otizm spektrum bozukluğu ile davranışsal ve bilişsel eksikliklerin eşlik ettiği anormal beyin morfolojisi görülmüştür (47). Bu bulgular, maternal ve fetal sitokin bağışıklık yanıtlarının, yavru beyin gelişimi üzerine etkilerinin araştırılmasında, viral mimik poliinosinik: polisitidilik asit (poli(I:C)) ve bakteriyel mimik LPS dahil olmak üzere immünostimülanların kullanımına yol açmıştır (43,48).

Deney hayvanlarında sürdürülen çalışmalarda, patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler) ve hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) tarafından tetiklenen TLR'nin, maternal inflamatuvar faktörler ve yavru beyin gelişiminin immün-aracılı olarak bozulması arasındaki ortak payda olduğunu göstermiştir (49).

Egzojen ve endojen tehditler tarafından indüklenen ilk sinyaller olan PAMP'ler ve DAMP'ler sırasıyla, pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminin gerçekleşmesi için doğal immün yanıtları aktive eden TLR'ler tarafından algılanır. TLR'ler periferik bağışıklık hücreleri ve mikrogial ve nöronlar da dahil olmak üzere SSS hücrelerinde ifade edilen patern tanıma reseptörleridir (49,50). Poly(I:C) ve LPS ile maternal immün aktivasyon oluşturulan *in vivo* çalışmalarda bu ajanların TLR'lerin alt tipi olan TLR3 ve TLR4'ü stimüle ederek maternal inflamatuvar yanıtı tetiklediği ortaya konulmuştur (48). Benzer şekilde insanlarda da diyabet, pre-eklampsi, depresyon, gibi kronik inflamatuvar koşullarda hücrel hasar sonucu ifadesi artan protein gruplarının TLR4'ü uyardığı bulunmuştur (51-53).

Mevcut çalışmalar, bir dizi çevresel faktörün ve hastalık durumlarının gebelik sürecinde TLR mekanizmasıyla ortak paydasının olduğunu ve anne kanında, plasentada ve fetal beyinde adaptif bağışıklık üzerindeki downstream mekanizmaları da etkileyerek daha komplike sonuçlara yol açabileceğini göstermiştir (54,55).

Annede gelişen düzensiz immün yanıtlar ve bunların sonucunda gelişen antikorların fetüse de iletildiği bilinmektedir (46). Yapılan *in vivo* çalışmalarda sitokinlerin MİA'nın gelişmekte olan fetüs üzerinde önemli etkileri olduğunu kanıtlanmıştır (56,57). Çevresel faktörlere yanıt olarak annede üretilen pro-inflamatuvar sitokinler ve bunlarla birlikte plasenta, amniyotik sıvı ve fetal beyinde artan pro-inflamatuvar sitokinler ileriki dönemlerde fetal davranışsal değişimlere yol açabilmektedir (56,58). TNF ve IL-1 β 'nın MİA'ın fetüse olan etkisinin düzenlenmesinde önemli rolü bulunduğu gösterilmiştir. Fetal beyinde ifade edilen sitokinlerin immünte ve normal beyin gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (45). MİA'nın fetal beyinde pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengeyi bozarak nörogelişimsel süreçte uzun süreli etkileri olabilmektedir ve sitokin ekspresyonlarındaki bu değişimler sinaptik fonksiyonun ve buna bağlı olarak sinir iletimini bozabilmektedir. Bunun yanı sıra, prenatal immün

değişimlerinin, beyin plastisitesinde değişikliğe yol açarak nörogenez sürecini de etkilediği bilinmektedir (59,60).

İnflamasyonun önemli moleküler sinyal mekanizmalarında yer alan NF- κ B transkripsiyon faktörü, sıradışı ve hızlı regülasyonu, kontrol ettiği geniş gen yelpazesi, immünolojik süreçlerdeki merkezi rolü, alt birimlerinin karmaşıklığı ve çeşitli hastalıklarla belirgin ilişkisi nedeniyle birçok alandaki araştırmacılar tarafından ilgi görmüştür. NF- κ B için birincil kontrol seviyesi, inhibitör kappa B (I κ B) adı verilen bir inhibitör protein ile etkileşimlerdir. Yapılan çalışmalar, NF- κ B'yi farklı mekanizmalarla düzenleyen birden fazla I κ B formunun varlığını doğrulamıştır. NF- κ B, hücrelerin LPS'ye veya TNF veya IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlere maruz kalması, viral enfeksiyon veya belirli viral gen ürünlerinin ekspresyonu, UV ışınları, B veya T hücre aktivasyonu ve diğer fizyolojik veya fizyolojik olmayan uyaranlarla aktive edilebilir. NF- κ B'nin aktivasyonu, I κ B'nin hedeflenen fosforilasyonu ve ardından degradasyonu ile kontrol edilmektedir (61).

2.2.1. Fetal Nörogenez ve Oluşum Mekanizmaları

Nörogenez, yeni sinir hücrelerinin (nöron) oluşumu olarak tanımlanmaktadır (62). Memelilerde SSS'deki kök ve prekürsör hücrelerden işlevsel nöronları üretme sürecinin, embriyonik ve erken doğum sonrası gelişim sırasında gerçekleştiğine inanılırken, daha sonrasında yetişkin beyinde nörogenezin keşfiyle bu dogmaya karşı çıkmıştır. Ezra Allen, yetişkin albino ratların beyin yan duvarlarında mitoz bölünmenin devam ettiğini gösteren ilk kişi olmuştur (63). Daha sonrasında, Altman ve Das bu araştırmayı takiben yetişkin rat ve kobay hipokampusünde nörogenezin meydana geldiğini belirlemişlerdir (64,65). O zamandan beri, yaşam boyu insan hipokampusünde bu sürecin varlığını gösteren kanıtlar birikmiştir. Tartışmalar devam etse de, genel olarak nörogenezin yetişkin hipokampusunda meydana geldiği ve işlevsel önemi olduğu kabul edilmektedir (66).

Kemirgenlerde nöronların, en erken nöranal kök hücreler olarak bilinen nöral epitel hücrelerinden yaklaşık embriyonik gün (EG) 9 ile 9.5 arasında geliştiği bilinmektedir. EG 15-17.5 ile kortikal ve subkortikal alanları içeren tüm nöronlar üretilip, göç etmektedir (67,68). Ratlarda, postnatal 2. günde, insanlarda ise gebeliğin 25. haftasında nörogenez sürecinin tamamlandığı bilinmektedir (62). Nörogenez,

nöronal plastisitenin oluşumu, organizmanın çevreye adaptasyonu gibi durumlarda oldukça önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, canlının yaşam boyu öğrenme-bellek fonksiyonlarının sağlanmasında da etkin rol oynamaktadır (69).

Deney hayvanlarında gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar, yetişkin hipokampusunda yeni oluşan granül hücrelerinin elektro fizyolojik olarak işlevsel olduğuna ve mevcut nöronal ağlara entegre olduğuna dair önemli kanıtlar sağlamıştır (70,71). Davranış çalışmaları bu yeni granül hücrelerin, uzaysal öğrenme ve bellek gibi bilişsel süreçlerde ve ruh hali düzenlemesinde önemli roller oynadığını göstermektedir. Nörodejeneratif ve psikiyatrik durumların patogeneğinde zarar görmüş hipokampal nörogenez bildirilmiştir ve hipokampal nöral kök hücrelerini hedefleyen terapötiklerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (72,73).

Ergenlik ve yetişkinlik dönemlerinde nörogenez oluşumu daha yavaş gerçekleşmektedir (74). Yetişkin insan hipokampal nörogeneğinde yaşa bağlı olarak gerileme gerçekleştiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır (66). Moreno-Jiménez ve ark. immatür nöron sayısı ile yaş arasındaki negatif korelasyonu göstermiş olup, Alzheimer hastalarında yeni nöronların sayısının sağlıklı insanlara kıyasla ciddi derece azaldığını bildirmişlerdir (75).

SSS gelişiminin düzenlenmesinde doğuştan bağışıklık hücreleri olan mikroglialar önemli rol oynamaktadır. Bu hücreler SSS'nin farklı bölgelerinde yaşam boyu devam eden çok çeşitli işlevlere sahiptir ve SSS gelişimi boyunca nörotrofinlerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımı aracılığıyla nöronların hayatta kalmasına, gelişmesine ve işlevlerini yerine getirmesine katkı sağlar (76-78). Bunun yanı sıra, glutamerjik reseptörlerin olgunlaşmasını ve sinaptik iletimi düzenlerler. Hatta bazı nörolojik bozukluklarda inflamatuvar koşullar altında nörogenezi baskılayarak önemli terapötik etkileri olabilir (79-81). Nöronlar veya glial hücrelerin gelişiminde beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB) olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri önemli rol oynamaktadır (82). Astrositler, SSS'de büyük ölçüde bulunan bir diğer hücre tipleridir. Nöronlara yapısal, trofik ve metabolik destek sağlayarak, sinaptik aktiviteyi düzenler ve kan-beyin bariyeri oluşturan endotelial hücrelere biyokimyasal bakım sağlarlar. Glutamat alımını, salınımını, sitokin ve nitrik oksit

üretimini sağlayarak nöronal sağ kalımı etkiledikleri ve SSS fonksiyonlarında kritik öneme sahip oldukları bilinmektedir (83,84). SSS astrositleri klasik olarak üç ana tipe ayrılır bunlar; ventrikülleri çevreleyen radyal astrositler, gri maddedeki protoplazmik astrositler ve beyaz maddedeki fibröz astrositlerdir. Glial fibriler asidik protein (GFAP) ve kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin üyesi olan S100B proteinini sıklıkla kullanılan astrosit belirteçleridir (83-85).

GFAP, 50 kDa ağırlığında insanlarda beyin dokusunda ifade edilen, SSS beyaz cevherinin korunması ve KBB bütünlüğü dahil olmak üzere fibröz astrosit normal fonksiyonu için gerekli olan astrosite özgü bir tip III filament proteinidir (86). Ayrıca bu proteinin ratlarda da benzer şekilde beyin dokusunda ifade edildiği ve GFAP ifade düzeylerinin 2, 6, 21 ve 104 haftalık rat beyin dokunlarında gradient şekilde arttığı bilinmektedir (87,88). GFAP'ın SSS'deki glial hücrelerin iç ortamın homeostazını koruduğu bilinmektedir. Glial hücreler ve özellikle astrositler aktivasyon ve proliferasyon yoluyla glial skarlar oluşturur. Astrositler, yaralanma, iske mi, KBB hasarı, inflamatuvar reaksiyon, anormal metabolizma ve oksidatif stres gibi faktörler tarafından uyarılabilen çeşitli inhibitör faktörler salıverirler. Bu faktörler aracılığıyla SSS'de akson rejenerasyonunu ve nörolojik fonksiyonun iyileşmesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (89). Astrosite özgü olan GFAP geninin ifadesi, başta Janus kinaz-2/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 kaskadı ve NF- κ B olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü (TF) tarafından düzenlenmektedir (68,69). GFAP ifadesi ayrıca nöronal aktivite ve hormonlar tarafından ortaya çıkarılan protein kinaz ve diğer sinyal molekülleri tarafından da modüle edilmektedir (92). Ayrıca çevresel zorluklara yanıt olarak birleşme ve polimerleşme durumlarındaki hızlı değişimler nedeniyle yüksek morfolojik plastisiteye sahiptir. Bu durum astrositlere komşu nöronlar arasında fiziksel bariyer ve hücre dışı ortamın dengeleyicisi işlevlerini kazandırır. Astrositlerin bir belirteç proteini olarak GFAP'ın upregülasyonunun ve yeniden düzenlenmesinin, nöroinflamasyon, iskemik inme, nörodejenerasyon, psikiyatrik bozukluklar ve MSS'deki diğer hastalıklar gibi birçok nörolojik hastalığın ortaya çıkmasında ve gelişmesinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir (93-95). Ayrıca GFAP inhibisyonunun ise nöronal ölümü artırdığı GFAP'ın sinir sistemi hasarındaki koruyucu etkilerini düşündürmüştür (96). GFAP'i içeren astrosit ara filament protein

sisteminin sadece hücre iskeleti için önemli bir bileşen olmadığı, aynı zamanda çeşitli stres koşullarına yanıt veren ve çoklu proteinler aracılığıyla hücre boyutunu, migrasyonunu ve survivalını düzenleyen önemli bir sinyal sistemi olduğu ortaya konulmuştur (97).

İkincil haberci olarak görev yapan kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) çeşitli enzim üretimi, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi çeşitli fizyolojik olaylarda yer alan sinyalizasyon için önemli bir bileşendir (98,99). Çok sayıda fonksiyonu olan ve kalsiyum bağlayıcı proteinler olarak adlandırılan bazı heterojen proteinler bu iyonlara belirli alanlarda bağlanırlar. Sitozolde Ca^{+2} konstrasyonunun kontrolünün sağlanmasında ve hücre membranları boyunca Ca^{+2} taşıyıcısı olarak ya da diğer sinyal mekanizmalarında görevli modülatörler olarak görev alırlar. Bu yüzden kalsiyum bağlayıcı proteinler Ca^{+2} sinyal transdüksiyonunda anahtar bileşenlerdir ve farklı hücre içi sinyal mekanizmalarına etki eden ve Ca^{+2} homeostazını sağlayan taşıyıcı proteinlerle etkileşime girmektedir (100). Bunlar arasında parvalbumin, calbindin ve kalretinin morfolojik olarak heterojen internöron sınıfında yer almaktadır (101).

S100 protein ailesi, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin en büyük temsilcisidir. İlk olarak 1960'lı yıllarda izole edilmiştir ve başlangıçta sığır beyinde tespit edildiği için sinir dokuya özgü olarak tanımlanmıştır (102). Daha sonra yapılan çalışmalar S100'ün diğer organ ve dokularda da ifade edildiğini ortaya koymuştur (103).

S100'ler amino asit dizilerinde %20-80 homoloji gösteren yaklaşık 20 molekülden oluşan farklı doku ve organlarda ifade edilen çok işlevli proteinlerdir. S100 proteinlerinin bazıları sadece Ca^{+2} 'a bağlanmakla kalmazlar aynı zamanda bakır ve çinkoyada bağlanan EF-el tipi domainler içerebilmektedir (104). Yapısal olarak, S100 proteini ' α ' ve ' β ' olarak tanımlanan sırasıyla 'A' ve 'B' olarak adlandırılan iki alt birimden ve α - α , α - β ve β - β olmak üzere üç izoformdan oluşur. Toplamda 16 tane S100A (S100A1-S100A16) ve ayrıca S100B, S100G, S100P ve S100Z olmak üzere 20'den fazla küçük asidik protein formu bulunmaktadır. Bunlardan α - β (S100A) ve β - β (S100B) en yaygın olanlarıdır (105). S100A alt birimi genellikle iskelet kası, miyokard, karaciğer, akciğer, böbrek ve pankreas dokularında

ifade olurken (106), S100B alt birimi, insan beyinde bulunan S100 proteinlerinin %96'sını ve beyin kökenli proteinlerin %0.5'ini oluşturmaktadır (107).

S100B, 11 kDa ağırlığında bir protein olup aynı zamanda hücre içi ve hücre dışı düzenleyici faaliyetlerde rol oynayan SSS astrositlerine özgün bir alt birimidir. S100B, insanda beyin başta olmak üzere yağ dokusu, lenf nodu, adrenal bez, kalp, akciğer ve testis gibi çeşitli dokularda ifade edilmektedir (108,109). Ratlarda da benzer şekilde beyin dokusu başta olmak üzere adrenal bez, karaciğer, akciğer, böbrek ve testis gibi çeşitli dokularda ifade edildiği bilinmektedir. Beyinde ifade düzeyinin 2, 6, 21 ve 104 haftalık ratlarda gradient şekilde arttığı bilinmektedir (110). Fizyolojik koşullar altında S100B ağırlıklı olarak SSS'nin astroglial hücrelerinde ve az oranda da nöronlar, oligodendrositler ve mikroglia da ifade edilmektedir (108,109). Hücre dışında, S100B apoptoz ve hücrel inflamatuvar aktiviteleri düzenleyerek, nöronal sağkalımı, farklılaşmayı, astrosit proliferasyonunun ve nöronal bozunmayı uyarır (111). Nanomolar konsantrasyonlarda, S100B nöronların survivalının, gelişmesinin veya nöronal hücrelerin çoğalmasının sağlanmasıyla ilişkili nörotrofik etkiler gösterir. Fakat *in vitro* çalışmalar, mikromolar konsantrasyonlarda S100B'nin proinflamatuvar sitokin salıverilmesini artırdığı ve apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur (101). Bununla birlikte, inflamasyon, iskemi, travma, şizofreni ve depresyon gibi nöropatolojik durumlarda S100B'nin beyindeki dağılımı hücrel düzeyde değişebilmektedir (112,113). Periferik örneklerde ölçülebilen beyin kökenli bir protein olan S100B, genellikle beyin hasarı için biyokimyasal belirteç olarak kullanılır. Bu proteinin nöroinflamasyondaki rolü daha belirgin şekilde ortaya konulmuştur, yüksek oranda memeli sinir sisteminin astroglial hücrelerindeki ifade düzeyinin (114,115), nöroinflamatuvar durumda mikroglial, oligodendrositler, radyal glia ve farklı nöron sınıflarında da gözlemlendiği belirlenmiştir (108,109,116).

CREB, 43 kDa ağırlığında bir proteindir, insanlarda ve ratlarda beyin, kolon, kalp, karaciğer, akciğer ve testis gibi çeşitli dokularda ifade edilmektedir. 2 haftalık rat beyin dokularında, CREB ifade düzeyinin 6, 21 ve 104 haftalık beyin dokularına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (117,118). CREB, cAMP yanıt elemanları aracılığıyla hücre çoğalması, büyüme, hayatta kalma ve farklılaşma gibi fizyolojik süreçler için gerekli olan cAMP bağımlı protein kinaz aracılığıyla serin 133

pozisyonunda fosforilasyonunun yanı sıra Ca^{+2} ve nörotrofik faktöre bağlı sinyal mekanizmaları tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür (119). Ayrıca CREB’inde yer aldığı sinyal mekanizmasının nöronal sağkalım, plastisite, öğrenme ve bellek gibi önemli süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (120). Yetişkin hipokampusünde nöroenez üzerindeki etkisi de belirlenmiştir (121).

2.2.2. Nöroinflamasyon ve Nöroenez İlişkisi

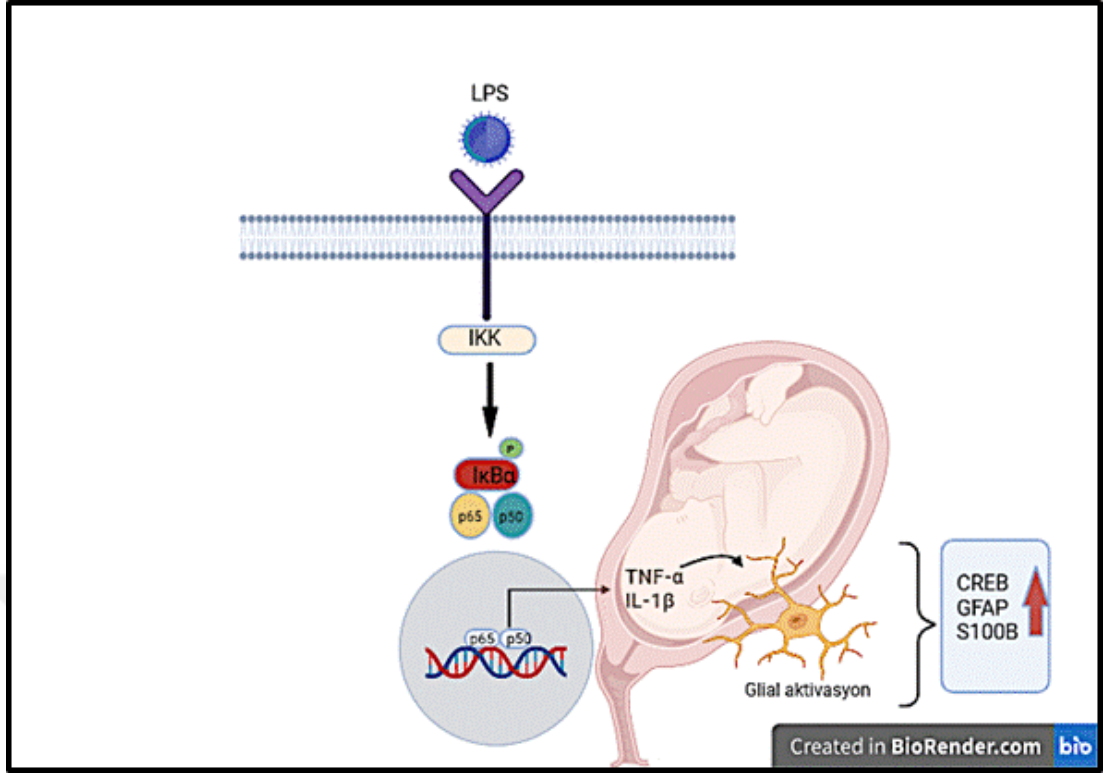
Sitokinler, esas olarak mikroglia ve astrositlere ek olarak monositler, makrofajlar ve lenfositler gibi bağışıklık hücrelerinden salınan proteinlerdir (15-25 kDa). İnflamasyon, enfeksiyon ve/veya immünolojik değişiklikler gibi durumlarda aktive olurlar ve hasarlı dokuların onarımı ve homeostazın restorasyonunun sağlanmasında görev alırlar (122,123). Sitokinler, bağışıklık hücreleri arasındaki sinyallere aracılık eder ve sırasıyla inflamatuvar yanıtları kolaylaştıran ve inhibe eden, pro inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler olarak ikiye ayrılır. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α en yaygın olarak araştırılan pro-inflamatuvar sitokinlerdir, IL-4 ve IL-10 ise iyi bilinen anti-inflamatuvar sitokinlerdir. Yapılan çalışmalar çoğu sitokinlerin pro- ya da anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra pleiotropik etkileri olduğunu ve birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynadığını göstermiştir (124). Fizyolojik koşullar altında sitokin seviyeleri genellikle düşük seviyede bulunurken, travma, enfeksiyon, iskemik-atak gibi SSS mikro-ortamında değişikliğe yol açan durumlarda sitokinler glial hücreler tarafından aktive edilir (125,126). Patolojik durumlarda fizyolojik koşulların 100 katı kadar sitokin seviyelerinde artış görülmektedir (127).

İlk başlarda beyinin bağışıklık açısından ayrıcalıklı bir bölge olduğu düşünülürken, sitokinlerin büyük moleküller olmasına rağmen KBB’yi geçebildiği gösterilmiştir (128). Mikroglia, beyindeki sitokinleri ve inflamatuvar süreçleri düzenlemektedir. Bu hücreler periferik makrofajlara benzer şekilde bir bağışıklık fonksiyonuna sahiptir (129,130). Aynı zamanda nöronal aktivitelerde de yer almaktadır. Fizyolojik koşullar altında sinaptogenez, nöroenez ve pro-inflamatuvar sitokin aktivasyonu yoluyla nötrofik faktörlerin aktivasyonu gibi süreçlerde rol oynarlar (131-133). Beyinde hasar gerçekleştiğinde, mikroçevrenin homeostazi bozulur, mikroglial aktif fenotiplere dönüşür ve pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif oksijen türevlerinin sekresyonu gerçekleşir (134,135). Artan

pro-inflamatuar mediyatörlerle SSS'deki nöronal bütünlük sağlanmaya ve eski haline getirilmeye çalışılsa da, kontrolsüz ve uzun süreli meydana gelen inflamatuvar değişiklikler artışıyla nöronlarda ciddi derecede hasar meydana getirebilir. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinler sinirsel aktivitelere ve inflamatuvar süreçlere aracılık eder ve pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengesizlik nöronal hasarın derecesini belirler. Özellikle gelişimin erken döneminde aktifleşmiş pro-inflamatuar sitokinler beyin üzerinde zararlı etkiler gösterebilir. Bu sitokinlere özellikle doğum öncesi maruz kalma, fetüste hipokampusta gliozise, uzaysal bellekte bozulmaya ve nöronal kayba neden olabilmektedir (136). Sinir kök hücrelerinden yeni nöronlar üretme sürecini ifade eden nörogenez, kök hücre proliferasyonu, nöronal farklılaşma ve yeni oluşan nöronların mevcut fonksiyonel nöronal devreye entegrasyonu gibi süreçlerden oluşmaktadır (137,138). Nörogenez, proinflamatuar sitokinlerle ve nöroinflamasyon ile yakından ilişkilidir (139). Proinflamatuar sitokin reseptörleri, hipokampus gibi bilişsel işlevlere sahip bölgelerde yüksek oranda kümelenmiştir (140,141). Çeşitli çalışmalar, proinflamatuar sitokinlerin hipokampusta yetişkin nörogenezi üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermiştir. Monje ve ark. (2003), mikrogliyal aktivasyon sonucu ifade edilen IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin hipokampal nörogenez üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir (142).

TNF- α aynı zamanda nörogenezin inhibisyonuna yol açan başlıca pro-inflamatuar sitokinlerden biridir (142,143). TNF- α 'nın nörogenezdeki etkilerine tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR)-1 ve TNFR-2 reseptörleri aracılık eder. Önceki çalışmalar hücre içi bir "ölüm alanı" içeren TNFR-1'in, hipokampal yetişkin nörogenezi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu, TNFR-2'nin ise nörogenezin sağlanmasında rolü olduğunu göstermiştir (144-146).

IL-1 β 'da özellikle hipokampal bölgede nörogenez ile ilişkili pro-inflamatuar sitokinlerden bir diğeridir. IL-1 β ayrıca IFN- γ ile indüklenen nörogenezin baskılanmasında yer alır. IL-1 β inhibisyonunun akut stresin neden olduğu nörogenezdeki azalmayı geri çevirdiği ve kronik stresin neden olduğu anti-nörojenik etkileri azalttığı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. LPS indüksiyonu sonucu gerçekleşen fetal beyin hasarı ve oluşum mekanizmaları.

2.3. Fetal Nöroprotektif Terapötik Ajanlar

2.3.1. Magnezyum Sülfat ($MgSO_4$)

PE'nin gerçekleşeceği öngörülen durumlarda kullanılan fetal nöroprotektif bir ajandır. Pre-eklampsi tanısı konulan gebelerde profilaktik tedavi olarak kullanılırken, anne ve fetüste protektif etkisi olduğu kanıtlanmış ve preterm eylemi önlemek için tokolitik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (13,147,148). 1990'larda yapılan çalışmalar, $MgSO_4$ kullanan gebelere ait bebeklerde serebral palsy insidansının daha düşük olduğunu göstermiştir (149-151). Magnezyum iyonları hücre içi glikoliz, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücre zarı bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır (152). $MgSO_4$ 'ün fetal serebral damarlarda vazodilatör etki göstererek, hipoksik iskemik reperfüzyon gibi koşullarla indüklenen beyin hasarını azalttığı öne sürülmüştür (153). Bunun yanı sıra, pro-inflamatuar sitokinlerin ve serbest radikallerin seviyesini azaltarak anti-inflamatuar etki gösterdiği ve inflamasyona sekonder olarak gelişen serebral hücre ölümünü azalttığı ortaya konulmuştur (154).

Aynı zamanda, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini down-regüle ederek hücreye Ca^{+2} girişini azalttığı ve böylelikle eksitatör aksiyon potansiyelini azaltarak koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (155). Fakat $MgSO_4$ 'ün fetal beyinde nöronal hasarın önlenmesi üzerindeki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır ve nöroprotektif etkinin olup olmadığı, buna bağlı olarak preterm doğum riski olanlarda kullanımının önerilip önerilmemesine dair tartışmalar devam etmektedir. Bu tartışmalar doğrultusunda, preterm doğum ve buna bağlı olarak gelişebilecek sorunların önlenmesinde anti-inflamatuar ve nöroprotektif etki gösteren, teratojenik etkisi olmayan yeni moleküllere olan ihtiyaç devam etmektedir.

2.3.2. Folik Asit

Folik asit, vitaminin sentetik bir formudur ve yalnızca zenginleştirilmiş gıdalarda, besin takviyelerinde ve ilaçlarda bulunmaktadır. Koenzim aktivitesinden yoksundur ve hücre içinde metabolik olarak aktif tetrahidrofolat formuna indirgenmesi gerekir. L-5-metil-tetrahidrofolat (L-5-metil-THF) besinsel folatın baskın formudur ve normalde dolaşımda bulunan tek form olup, hücresel metabolizma için kullanılmak üzere periferik dokulara taşınmaktadır. Perikonsepsiyonel dönemdeki folat düzeyinin artırılmasının neonatal nöral tüp defekti riskini azalttığını gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Bu nedenle, folik asit takviyeleri veya zenginleştirilmiş gıdalar aracılığıyla gebeliğin erken dönemlerinde ve öncesinde folat alımının artırılması önerilmektedir. Ayrıca, folik asidin demans ve bazı kanser türleri de dahil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar giderek artmaktadır. Gebelikte günlük 4 mg folik asidin nöral tüp defekti riskini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (16).

2.3.3. Melatonin

Melatonin, epifiz bezi tarafından üretilen ve salgılanan endojen bir indolamin hormonudur (156). ROS'u nötralize ederek ve hücresel hasarı azaltarak antioksidan görevi görür. Ayrıca melatonin, nitrik oksit seviyelerini azaltarak ve sitokin ekspresyonunu düzenleyerek anti-inflamatuar özellik gösterir (14,157). Preterm beyin için melatonin seviyelerinin kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir, yapılan

prospektif bir çalışmada gebeliğin 34. haftasından önce doğan bebeklerde, term bebeklerin 3 günlerine kıyasla düşük miktarda melatonin görülmüştür (158-161). Melatoninin, geniş doz aralığında düşük toksisiteye sahiptir ve hipokampusta nöroeksitabiliteyi ve sinaptik iletimi düzenleyen nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinmektedir. *In vivo* prenatal beyin hasarı modellerinde melatoninin oligodendrosit olgunlaşmasını sağlayarak ve miyelinasyon onarımını artırarak, aksonal büyümeyi teşvik ederek ve mikroglial aktivasyonu azaltarak hipoksik, iskemik, inflamatuvar veya ilaca karşı gelişen beyin hasarlarına karşı nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Melatonin, potansiyel fetal nöroprotektif ajan olarak düşünülmektedir ve yapılan çalışmalar melatoninin gebelikte kullanımını desteklemektedir (162,163).

2.3.4. N-Asetil Sistein

N-asetil-L-sistein (NAC), FDA tarafından onaylı, asetaminofen toksisitesinin tedavisinde kullanılan asetillenmiş amino asittir (164). Nöroinflamasyonun sinaptogenezi bozduğu, ayrıca sinaptik glutamat salınımının azalmasına neden olarak eksitotoksik nörolojik hasarı da hafiflettiği gösterilmiştir (15). NAC'ın, sistin-glutamat antiporter sistemi üzerinden terapötik özelliklerini gösterdiği, bununla birlikte antioksidan olarak nöroinflamatuvar yanıtı düzenlediği bulunmuştur (15,165). *In vivo* ve klinik çalışmalarda, plasentayı ve KBB'yi geçtiği için fetomaternal oksidatif dengeyi sağladığı ve aşırı glutamatın eksitotoksik etkilerini azaltarak koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (166-168). Fakat, fetüste maksimum terapötik etkiyi elde etmek için maternal NAC kullanımında optimal zamanlamaya ilişkin ek çalışmalara duyulan ihtiyaç devam etmektedir.

Mevcut terapötik moleküllerin fetüste nöroprotektif etkileri ve bu etkilerinin altında yatan sinyal mekanizmalarına ilişkin veri yetersizliği devam etmektedir. Perinatal nörolojik hasarın artan prevalansı göz önünde bulundurulduğunda bu moleküllere alternatif yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalar önemini korumaktadır.

2.4. Kannabinoidler

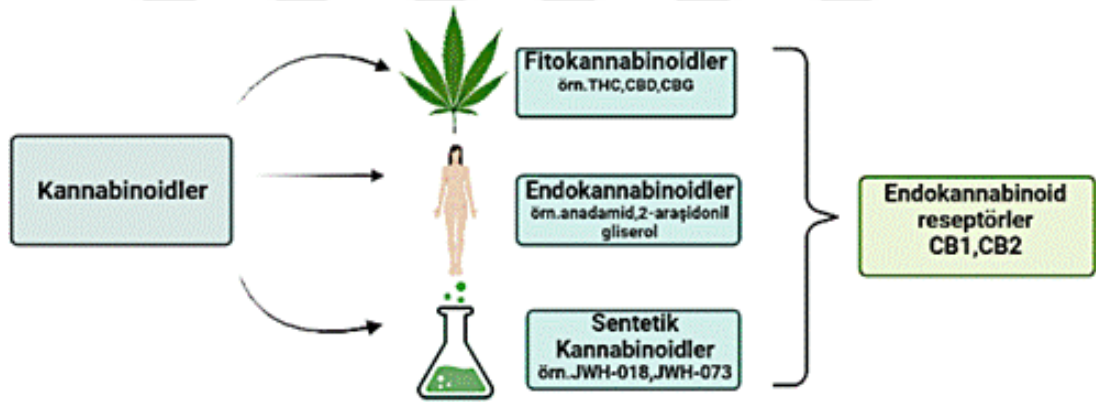
Cannabaceace familyasına ait olan *Cannabis sativa* (Hint keneviri) ve ikincil metabolitleri uzun zamandır tıbbi ve psikoaktif amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (17). *Cannabis sativa*, farklı düzeylerde psikoaktif kannabinoid THC içeren, marihuana ve kenevir olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Bugüne kadar kenevir bitkisinde 120'den fazla fitokannabinoid keşfedilmiştir. En yaygın olarak bulunan iki fitokannabinoid olan Δ^9 -THC ve CBD'nin anti-inflamatuar ve anti kanser özelliklerinin düzenlenmesinde potansiyel etkileri üzerine çalışılmıştır. Bununla birlikte, terpenler, karbonhidratlar, yağ asitleri ve esterleri, fitosteroller, fenolik yapılardan ve kannabinoidler olarak adlandırılan spesifik bileşenlerden oluşan *Cannabis sativa*'nın karmaşık bir kimyasal yapıya sahip olduğu bilinmektedir (18). 400'den fazla kimyasal bileşen elde edilen ve bunlardan 100'den fazlası fitokannabinoidler olarak adlandırılan terpeno-fenol bileşenler elde edilmiştir (169,170). Drog-tip olarak sınıflandırılan Cannabis, psikoaktif özelliği olan ve yaygın olarak bulunan Δ^9 -THC'yi yüksek oranda içermektedir (17). Lif-tipi olan Cannabis ise yüksek oranda CBD ve daha az oranda Kannabigerol (CBG) içermektedir ve bu türevlerin psikoaktif özelliği bulunmamaktadır (17).

Kannabinoidler üç gruba ayrılmaktadır, ilk grup endojen ligandlar olan ve nörotransmitterler gibi davranan, 1988'den sonra ilk kannabinoid reseptörlerin keşfiyle membran reseptörleri aracılı etki göstererek kannabinoid reseptörlerini aktive eden endokannabinoidlerden oluşmaktadır. Anandamit (AEA) ve 2-arasidonil-gliserol (2-AG) başlıca endokannabinoidlerdendir. İkinci grup, kenevir bitkisinden izole edilen fitokannabinoidlerden oluşur. Bu grup kannabinoidler de endokannabinoidler gibi kannabinoid reseptörleri ile etkileşime girerler. En yaygın olarak bulunan fitokannabinoidler sentetik prekürsör olan CBG'den türetilen Δ^9 -THC ve CBD'dir. Bunlardan psikoaktif özellikte olan Δ^9 -THC'nin anandamit ile benzer aktiviteye sahip olup CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinde güçlü agonist etkiye sahip olduğu, insanlarda ve hayvanlarda birçok patolojik durumda etkili olduğu gösterilmiştir.

Üçüncü grup ise sentetik kannabinoidler ise araştırmacıların 1970'lerde endokannabinoid sistemi keşfetmesiyle ve kanser ağrısı için yeni tedaviler geliştirme

çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır (18,171,172). Akademik laboratuvarlar veya ilaç endüstrisi tarafından sentezlenen ilk sentetik kannabinoidler, antinosisteptif aktiveye sahip selektif kannabinoid reseptör agonistleri olan 1974'te Pfizer tarafından sentezlenen sikloheksilfenol (CP 55,940) ve ardından 1988'de İbrani Üniversitesi'nde Mechoulam'ın grubu tarafından sentezlenen HU-210 bileşiği ile başlamıştır (171,173). Güney Carolina'daki Clemson Üniversitesi Kimya Profesörü John W. Huffman ve ekibi Δ^9 -THC'nin bazı özelliklerine sahip, beyinde yer alan CB1 ve periferik reseptörler olan CB2'lere etki eden analjezik özellikteki yeni kannabinoidleri sentezlemişlerdir. Bu ilaç adaylarından birisi JWH-018 olmuştur (174,175).

Spesifik reseptörlerin keşfiyle membran reseptörleri aracılı kannabinoid etkiler ortaya konulmuş olup, bu reseptörleri aktive eden endojen ligandlar endokannabinoidler (endojen kannabinoidler) olarak adlandırılmıştır (5,6). Kannabinoidler, fitokannabinoidlerin yanı sıra, endojen kannabinoidleri ve bu iki grubun sentetik analoglarını da içermektedir (18).



Şekil 2.2. Kannabinoidlerin sınıflandırılması (177).

2.4.1. Endokannabinoidler

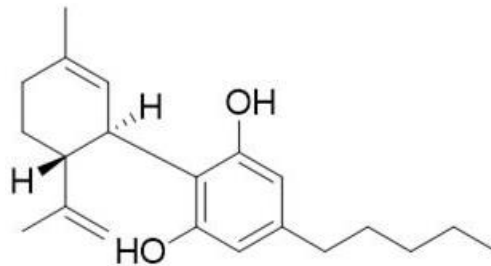
AEA ve 2-AG endokannabinoidler olarak adlandırılan endojen biyoaktif lipidlerdir. Veziküllerde depolanmamaktadırlar, ihtiyaç halinde endojen düzeyde sentezlenmektedirler. Endokannabinoid sistem esas olarak CB1 ve CB2 olarak tanımlanan G-proteini kenetli iki reseptörden oluşmaktadır, bunlardan CB1 esas olarak santral sinir sisteminde olmak üzere uterus, testis, prostat, mide, vasküler endotelium ve iskelet sisteminde bulunmaktadır (178). CB2 ise daha çok immün

sistemde bulunur, bunun yanı sıra inflamasyon gibi koşullarda santral sinir sisteminde de bulunmaktadır (179,180). Yapılan çalışmalar Δ^9 -THC'nin psikoaktif etkilerini CB1 reseptörleri üzerinden gösterdiğini, psikoaktif etki göstermeyen CBD ve CBG'nin ise CB1 ve CB2 reseptörlerine affinitesinin düşük olduğunu ortaya koymuştur (181). Kannabinoidler bazı etkilerini, CB1 ve CB2 reseptörlerine ek olarak G-proteini kenetli reseptör 55 (GPR55) ve GPR19 gibi G-proteini kenetli reseptörler, Peroksizom Proliferatör-Aktivate Reseptörler (PPAR) ve Transient Reseptör Potansiyel Kanalları (TRPV) üzerinden göstermektedir (182).

2.4.2. Kannabidiol (CBD)

Fitokannabinoidler *C.sativa*'nın dişi bitkileri tarafından bol miktarda üretilen trikomlar tarafından salgılanan reçinede bulunan, transferaz ve sentaz enzimleri aracılığıyla yağ asidi öncülerinden sentezlenen kimyasallardır. Endokannabinoid ve sentetik kannabinoidlerle ortak bir kimyasal yapıya sahip olduklarından farmakolojik etkileri benzerdir (183,184). CBD, yaygın olarak kullanılan fitokannabinoidlerden biridir. Ticari olarak geliştirilen ve eşit miktarda CBD ve THC içeren formülasyonlar (Epidolex®, Sativex®), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa tarafından onaylanmış olup, Dravet sendromu ile ilişkili nöbetlerin tedavisinde, Lennox-Gastaut sendromu ve tüberoskleroz kompleksi gibi durumlarda kullanılmaktadır (185).

CBD, CB1 reseptörlerinde negatif bir allosterik modülatör olarak görev yapar (186) ve CB2 reseptörleri, serotonin 1A (5-HT1A), opioid reseptörleri ve bazı ligand kapılı iyon kanalları reseptörlerine de etki eder (187).



Şekil 2.3. CBD'nin kimyasal yapısı.

2.4.2.1. CBD ve Nöroinflamasyon

İnflamasyon, yaralanma, enfeksiyon ve travma sonucu hücrelerin ya da dokuların gösterdiği biyolojik bir süreçtir ve bu durumlara karşı olan oluşan yeterli bir savunma mekanizması, maruz kalınan patojenlerin ortadan kaldırılmasına, yara iyileşmesine ve anjiyogenez sürecinin başlamasını sağlar (188). İnflamasyon periferik dokularda oluşabileceği gibi aynı zaman da akut ve kronik beyin hasarlarına yol açabilecek olan negatif etkenlerin oluşumuna da neden olabilir. Alzheimer ve Parkinson Hastalığı, Narkolepsi, Multiple skleroz (MS) gibi birçok hastalığın patolojisinde nöroinflamasyonun yer aldığı bulunmuştur (188). Beyinde bulunan özelleşmiş mikrogial hücreler başta olmak üzere nöronal kökenli hücreler, inflamasyona yanıt olarak hücreSEL kalıntıların temizlenmesi ve nörotrofik faktörlerin, sitokinlerin ve proteazların salıverilmesini düzenleyerek bir çeşit nöroprotektif etki gösterir. Bu yanıtın oluşmasını, mikrogial hücre aktivasyonu ve sinyal yollarının aktivasyonunu kapsar. Gram negatif bakterinin dış membranında bir endotoksin olan LPS, inflamatuvar hücrelerde TLR ile etkileşime girerek inflamatuvar yanıtı indükler (188). LPS mikrogial hücrelerde TLR4 reseptörüne bağlanarak mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) gibi NF- κ B aktivasyonuna yol açan çeşitli sinyal transdüksiyon mekanizmalarını aktive eder. NF- κ B aktivasyonu, pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ve nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi enzimlerin indüksiyonuna neden olarak santral inflamasyona katkıda bulunur (189).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kannabinoidlerin anti-inflamatuvar etkisi kanıtlanmış olup, CBD'nin LPS ile indüklenen glial hücrede NF- κ B aracılı yolağı inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterdiği ortaya konulmuştur (190). Metamfetamin ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde CBD'nin TLR4 aktivasyonuna bağlı NF- κ B yolağının inhibisyonuna neden olarak nöroprotektif etki gösterdiği ortaya konulmuştur (191).

Tüm bu literatür bilgisinden hareketle bu tez çalışması kapsamında CBD'nin gebelikte LPS ile indüklenen sistemik inflamasyon modelinde fetal beyinde nöroinflamasyon ve nörogenez sürecine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Cihazlar

- Kırık Buz Makinesi (Scotsman AF80)
- SDS-PAGE Dikey Elektrophorez sistemi (Bio-Rad, Miniprotean Tetracell)
- Güç kaynağı (Bio-Rad PowerPac Basic Power Supply)
- Transfer sistemi (Bio-Rad Mini Trans-blot cell)
- Mikropipet seti (0,5-10, 1-10, 10-100,100-1000 µL) (Thermo Scientific, F1 Series)
- Çok kanallı mikropipetler (10-100, 30-300 µL) (Thermo Scientific, F1 Series)
- Vortex karıştırıcı (Biosan, V1)
- Rocker çalkalayıcı (Biosan, MR12)
- Orbital çalkalayıcı (Biosan, PSU-20i)
- Karıştırılmalı blok ısıtıcı (Biosan, TS-100)
- Blok ısıtıcı (Biosan, TDB-100)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı (IKA, C Mag HS7)
- pH metre (Thermo, Orion Star A211)
- +4°C Buzdolabı (Bosch)
- -20°C Derin dondurucu (Ariston)
- Sonikatör (Bandelin 4000)
- Ultrasonik su banyosu (Elma P70H)
- Vakum pompası (Rocker Chemker 400)
- Etüv (Mettler UN55)
- Hassas terazi (Shimadzu AP224W)
- Analitik terazi (Precisa, 321 LX3200C SCS)
- Masaüstü soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific, SL8R)
- Mini spin (Thermo Scientific, mySPIN6)

- Mikro santrifüj (FisherBrand, mySPIN12)
- Su banyosu (Biosan, WB-4MS)
- Mikroplaka okuyucu (Spektrofotometre) (BioTek, Epoch2)
- Ultrasaf su cihazı (BLUELAB, Blueaqua-P)
- Distile su cihazı (BLUELAB, Blueaqua-B)
- Saf su cihazı (NÜVE,ND12)
- Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ChemiDoc XRS+)
- -80°C dondurucu (NÜVE, DF290)
- LC-MS/MS (Thermo Scientific, TSQ Fortis Ultimate 3000 UPLC)
- Işık mikroskopu (Zeiss, Primostar 3)
- Kamera (Zeiss, AxioCam)

3.2. Sarf Malzemeleri

3.2.1. Kitler

ELISA IL-1 β kiti Cloud Clone Corp'tan, BCA Protein Assay Kiti Thermo Scientific'ten temin edilmiştir.

3.2.2. Kimyasallar

Sodyum dodesil sülfat tuzu, Deoksikolikasit, Sodyum Klorür, Sodyum Azid, Amonyum Persülfat, Nonidet P-40, Gliserol, Magnezyum sülfat heptahidrat, Tris, 2-Merkaptoetanol (2-ME), TEMED, Tris HCl, Gliserol, Proteaz inhibitörü Amresco'dan, Bromofenol mavisi Bio-Rad firmasından, Ponceau S Stain, Yağsız süt tozu SERVA'dan, Methanol ve Ethanol Isolab firmasından, Asetonitril, Formik asit, Amonyum format Merck'ten, Fosfat tamponlu salin (PBS) ve Serum Albumini (Bovine Serum Albumin, BSA) Sigma Aldrich'ten, Streptavidin peroksidaz (#TS-125-HR), poliviniliden florür (PVDF) membran ve 3,3'-Diaminobenzidin (#TA-125-HD) Thermo Scientific firmasından, Xylazınbio %2 Bioveta'dan, Ketazol %10 Richter Pharma AG'den ve Kannabidiol (CBD), Süleyman Demirel Üniversitesi-Doğal Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (SUDUM) temin edilmiştir.

CBD'nin kaynağı *Cannabis sativa* L ekstresidir. CBD içeriği >99.9 ve THC içeriği <0.01'dir. Alkol kalıntısı ve ağır metal limitleri USP ve AB farmakopelerine uygundur.

İmmünoiblottlama çalışmalarında kullanılan tavşan (rabbit) poliklonal anti-GFAP (#16825-1-AP), anti-S100B (#15146-1-AP) ve anti-NF-κB (#10745-1-AP) antikorları Proteintech'ten, tavşan polyclonal anti-fosforile-(Ser536)-NF-κB (#BT-PHS00191) antikoru BT-Lab'dan, anti-CREB (#9192) antikoru Cell Signaling Technology firmasından, fare (mouse) monoklonal anti-β-actin antikoru Sigma Aldrich'ten, HRP bağlı tavşan veya fare ikincil antikorları Thermo Scientific firmasından temin edildi.

İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılan TNF-α primer antikoru (#bs-2081R) Bioss'tan, ikincil antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Antibody) Thermo Scientific firmasından temin edildi.

3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.3.1. 2X RIPA (Radyoimmünopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu

40 mg SDS (sodyumdodesilsülfatsodyum tuzu), 100 mg 7-DOC (deoksikolikasit) tartıldı. 0,4 ml NP-40, 4 ml 10X PBS ilave edilip distile H₂O ile 20 ml'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

3.3.2. 10X PBS (Phosphate Buffer Saline)

87,5 g sodyum klorür, 11,5 g sodyum monohidrojen fosfat, 2,3 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı ve distile H₂O ile 1L'ye tamamlanıp pH'sı 7,4'e ayarlandı. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklandı.

3.3.3. 10X Transfer Tamponu

30,33 g Tris-baz, 144 g Glisin distile H₂O'da çözündürülerek, 1L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

3.3.4. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

30,2 g Tris Baz, 144 g Glisin, 10 g SDS (sodyumdodesilsülfat sodyum tuzu) tartılıp, distile H₂O'da çözündürüldükten sonra 1L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı. 1X e seyreltilerek kullanılır.

3.3.5. 4X SDS-PAGE Ayırma Tamponu (Resolving Buffer)

1,5 M Tris HCl (90,855 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g), distile H₂O ile çözündürüldükten sonra 500 ml'ye tamamlandı. pH'sı 8.9 olarak ayarlandı ve 4°C'de saklandı.

3.3.6. 4X SDS-PAGE Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer)

0,5 M Tris HCl (30,285 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g) distile H₂O'da çözündürülerek 500 ml'ye tamamlandı. pH'sı 6,8'e ayarlandı. 4°C'de saklandı.

3.3.7. 4X Protein Yükleme Tamponu

10 ml 1 M Tris HCl (pH=6,8), 4 g SDS, 2 ml %99'luk Gliserol, 2 ml 14,7 M 2- ME, 5 ml 0,5 M EDTA, 40 mg Bromofenol mavisi distile H₂O'da çözündürülerek 50 ml'ye tamamlandı. 1'er ml olacak şekilde ependorf tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

3.3.8. 1X Yıkama Tamponu

100 ml 10X PBS, 1 ml Tween-20 distile H₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.3.9. %10 AP (Amonyum Persülfat) Çözeltisi

1 g AP 10 ml distile H₂O'da çözündürüldü ve 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı.

3.3.10. %5'lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı

5 g yağsız süt tozu 100 ml 1X yıkama tamponu içerisinde çözdürülten sonra, pH'sı 7,4'e ayarlandı.

3.4. Yöntem

Bu tez çalışmasında yer alan *in vivo* çalışmalar Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 17.06.2021 tarih ve 01/05 sayılı kararı ve 2013 Helsinki Deklerasyonu kapsamında gerçekleştirilmesine izin verilmiştir. *In vivo* çalışmalar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, *in vitro* çalışmalar Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı İlaç Tıbbi Cihaz ve Dermokozmetik Araştırma Laboratuvarında, biyokimyasal analizler Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı altyapısı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.1. Deney Hayvanları

Çalışma kapsamında kullanılan 30 adet 250-300 gr ağırlığındaki yetişkin dişi Wistar albino rat Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Hayvanlar *ad libitum* beslenme rejimi uygulanarak (bazal miktarda %21 protein içeren hazır standart pelet yem) ve 22-24 °C sıcaklık ve %55-60 nem olan oda şartlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olan ortam koşullarında Euro type-IV kafeslerde barındırıldı. Yetişkin dişi Wistar ratlar gebeliği indüklemek amacıyla yetişkin erkek ratlarla birlikte bir gece boyunca her kafeste 2 dişi ve 1 erkek rat olacak şekilde yerleştirildi (Resim 3.1.). Çiftleşmeden sonra 12 saat içerisinde vajinal smear alındı. Gebeliğin doğrulanmış olan ratlar rastgele 5 gruba ayrıldı.

Gebeliğin 15, 16 ve 17. günlerinde, üç tedavi grubuna 5 mg/kg, 10mg/kg ve 30 mg/kg dozlarında intraperitoneal (i.p.) CBD enjeksiyonları yapıldı. 17. gün son CBD enjeksiyonundan sonra 1 mg/kg dozunda 0.5 ml hacimde LPS (i.p.) ile sistemik inflamasyon modeli oluşturuldu. LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra ketamin (90mg/kg)/ksilazin (8-10 mg/kg) ile abdominal insizyonu takiben annenin vena cava

inferiorundan kan alındı. Daha sonra histerotomi ile fetal beyin ve plasenta dokuları alındı.

İmmünoablottleme ve ELISA çalışmaları Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında gerçekleştirildi. Fetal beyinde Western blot yöntemi ile her gruptan 6 örnek değerlendirmeye alınarak bu dokularda total-NF- κ B, fosforile-(Ser536)-NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB protein düzeylerine bakıldı. Ayrıca yükleme kontrolü olarak beta-actin protein düzeyleri incelendi. ELISA yöntemi kullanılarak fetal beyinde IL-1 β düzeyleri belirlendi. Ayrıca fetal beyin ve plasenta dokularında Hematoksilen-Eozin (HE) boyama ile rutin histopatolojik analizler ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile TNF- α düzeylerinin incelenmesi Süleyman Demirel Üniversitesi Teknokent büyesinde bulunan firmadan hizmet alımı yolu ile gerçekleştirildi. SUDUM'da LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi) analizleri gerçekleştirilerek fetal beyin dokularındaki CBD düzeyleri ölçüldü.

Deney hayvanları her grupta 6 adet olacak şekilde rastgele olacak şekilde toplam 5 gruba ayrıldı (Tablo 3.1.)

Bu gruplar;

1-Kontrol grubu (n=6): Gebeliğin 15. ,16. ve 17. günlerinde 1 ml hacminde %100 etanol i.p. solüsyonu uygulandı. Son uygulamadan sonra 0.5 ml hacminde serum fizyolojik (SF) i.p. uygulandı ve 6 saat sonra hayvanlar sakrifiye edildi.

2-LPS grubu (n=6) : Gebeliğin 15. ,16. ve 17. günlerinde 1 ml hacminde %100 etanol i.p. solüsyonu uygulandı. Son uygulamanın ardından 0.5 ml hacminde 1 mg/kg i.p. LPS uygulandı ve LPS uygulamasından 6 saat sonra hayvanlar sakrifiye edildi(1) .

3-LPS + CBD 5mg/kg grubu (n=6) : Gebeliğin 15. ,16. ve 17. günlerinde 1 ml hacminde 5 mg/kg i.p. CBD uygulandı. Son uygulamadan sonra 0.5 ml hacminde 1 mg/kg i.p. LPS uygulandı ve 6 saat sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi.

4-LPS + CBD 10mg/kg grubu (n=6): Gebeliğin 15. ,16. ve 17. günleride 1 ml hacminde 10 mg/kg i.p. CBD uygulandı. Son uygulamadan sonra 0.5 ml

hacminde 1 mg/kg i.p. LPS uygulandı ve 6 saat sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi (2).

5.LPS + CBD 30mg/kg grubu (n=6) : Gebeliğin 15. ,16. ve 17. günlerinde 1 ml hacminde 30 mg/kg i.p. CBD uygulandı. Son uygulamadan 1 mg/kg i.p. LPS uygulandı ve 6 saat sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi (3).

Tablo 3.1. Deney grupları ve ajan uygulama planı.

Gruplar	15. gün	16. gün	17.gün
<i>Kontrol</i>	1ml %100 EtOH	1ml %100 EtOH	1ml %100 EtOH + 0.5 ml SF
<i>LPS</i>	1ml %100 EtOH	1ml %100 EtOH	1ml %100 EtOH + 1 mg/kg LPS
<i>LPS+ CBD 5mg/kg</i>	1ml 5mg/kg CBD	1ml 5mg/kg CBD	1ml 5mg/kg CBD + 1 mg/kg LPS
<i>LPS+ CBD 10mg/kg</i>	1ml 10mg/kg CBD	1ml 10mg/kg CBD	1ml 10mg/kg CBD + 1 mg/kg LPS
<i>LPS+ CBD 30mg/kg</i>	1ml 30mg/kg CBD	1ml 30mg/kg CBD	1ml 30mg/kg CBD + 1 mg/kg LPS



Resim 3.1. Gebelik modelinin indüksiyonu amacıyla 2 dişi ve 1 erkek ratın kafeslerde barındırılması.



Resim 3.2. Çalışmada kullanılan bir ratın ağırlığının ölçülmesi.

Tablo 3.2. Tüm gruplara ait ratların ölçülen ağırlıkları.

Rat No	Gruplar				
	<i>Kontrol</i>	<i>LPS</i>	<i>LPS + CBD 5mg/kg</i>	<i>LPS + CBD 10mg/kg</i>	<i>LPS + CBD 30mg/kg</i>
1	278 g	298 g	307 g	264 g	316 g
2	273 g	306 g	309 g	300 g	294 g
3	278 g	281g	305 g	282 g	312 g
4	264 g	310 g	336 g	342 g	328 g
5	231 g	307 g	324 g	318 g	273 g

3.4.2. Vajinal Smear Örneklerinin Alınması ve İncelenmesi

Gebeliğin 0. günü vajinal kanalda sperm varlığını tespit edebilmek için örnek alındı ve Pap smear boyama için lama yayıldı. Lama yayılan örnekler %100 EtOH'da 3 dakika, %95 EtOH'da 3 dakika ve sonrasında 3 dakika distile sudan geçirildi. Preparatlar Harris HE ile 5 dakika boyunca boyandı. 5 dakika boyunca distile sudan

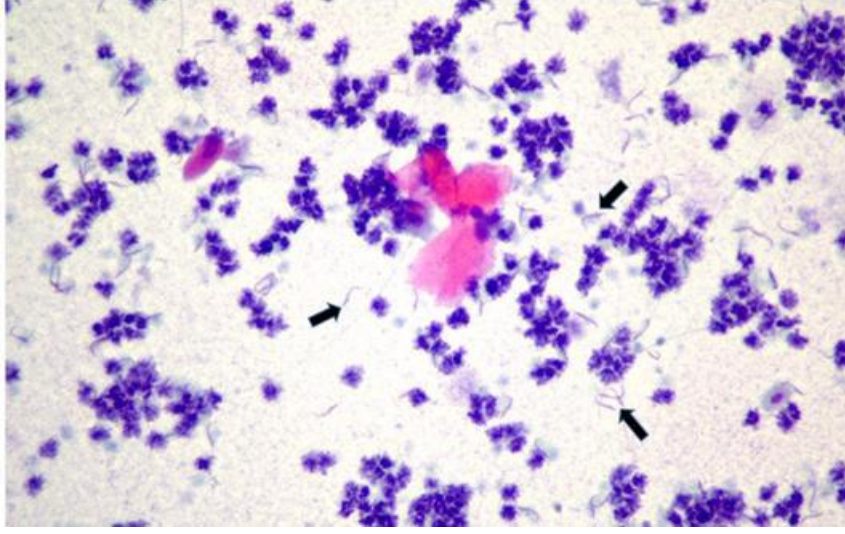
geçirildi ve ardından 5 dakika boyunca Orange G ile boyandı. Ardından 5 dakika boyunca distile sudan geçirildi ve 5 dakika boyunca zıt boyama yapıldı. Yıkamanın ardından preparatlar 5 dakika boyunca eozin ile boyandı. 5 dakika boyunca yıkama yapıldı ve preparatlar önce %95 EtOH'de 3 dakika ardından %100 EtOH'de 3 dakika boyunca dehidrate edildi. Alkolle muamele sonra ksilolde 3 dakika tutuldu ve Entella ile kapatılarak ışık mikroskopunda sperm tespitleri yapıldı.



Resim 3.3. Vajinal smear örneklerinin alınması.



Resim 3.4. Alınan örneklerin Pap smear boyama sonrası lam tepsisine yerleştirilmesi ve numaralandırılması.



Resim 3.5. Pap smear boyama sonucu incelenen örneklerin mikroskopik görüntüsü. Oklar preperatta gözlenen spermleri gösterir.

3.4.3. Kannabidiol ve Lipopolisakkarit Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması

CBD dozları sırasıyla, ratların ağırlıklarına göre 5mg/kg, 10mg/kg ve 30 mg/kg olacak şekilde 1 ml %100 EtOH içerisinde çözülerek günlük olarak hazırlandı, gebeliğin 15., 16. ve 17. günlerinde 3 gün boyunca i.p. olarak 1.0 ml'lik insülin enjektörleri kullanılarak uygulandı.

LPS dozu ratların ağırlıklarına göre 1mg/kg olacak şekilde 0.5 ml SF içerisinde çözüldü, gebeliğin 17. gününde son ajan uygulamalarını takiben i.p. olarak uygulandı.

Kontrol grubundaki ratlara diğer gruplardaki ratların uygulamalarını takiben 15., 16. ve 17. günlerde 1 ml % EtOH solüsyonu ve 0.5 ml SF uygulaması i.p. olarak yapıldı.



Resim 3.6. Ajanların ratlara i.p. olarak uygulanması.

3.4.4. Histerotomi ve Sakrifikasyon

Gebeliğin 17. gününde LPS uygulamasından 6 saat sonra, gebe ratların ağırlıklarına göre hazırlanan ketamin (90mg/kg)/ksilazin (8-10 mg/kg) ile abdominal insizyonu takiben annenin *vena cava inferior*'undan kan alındı. Daha sonra histerotomi ile fetüsler alındı ve ardından fetal beyin ile plasenta dokuları ayrıldı.



Resim 3.7. *Vena cava inferiordan* kan alımı.



Resim 3.8. Histerotomi işlemi ile alınan fetüsler.



Resim 3.9. Fetal beyin ve plasenta dokularının ayrılması.

Fetal beyin ve plasenta dokularının bir bölümü histopatolojik incelemeler için %10'luk formaldehit içeren steril kaplara konuldu (Resim 3.10.). CBD konstrasyonlarının belirlenmesi için yapılacak olan LC-MS/MS ve protein ifadesi

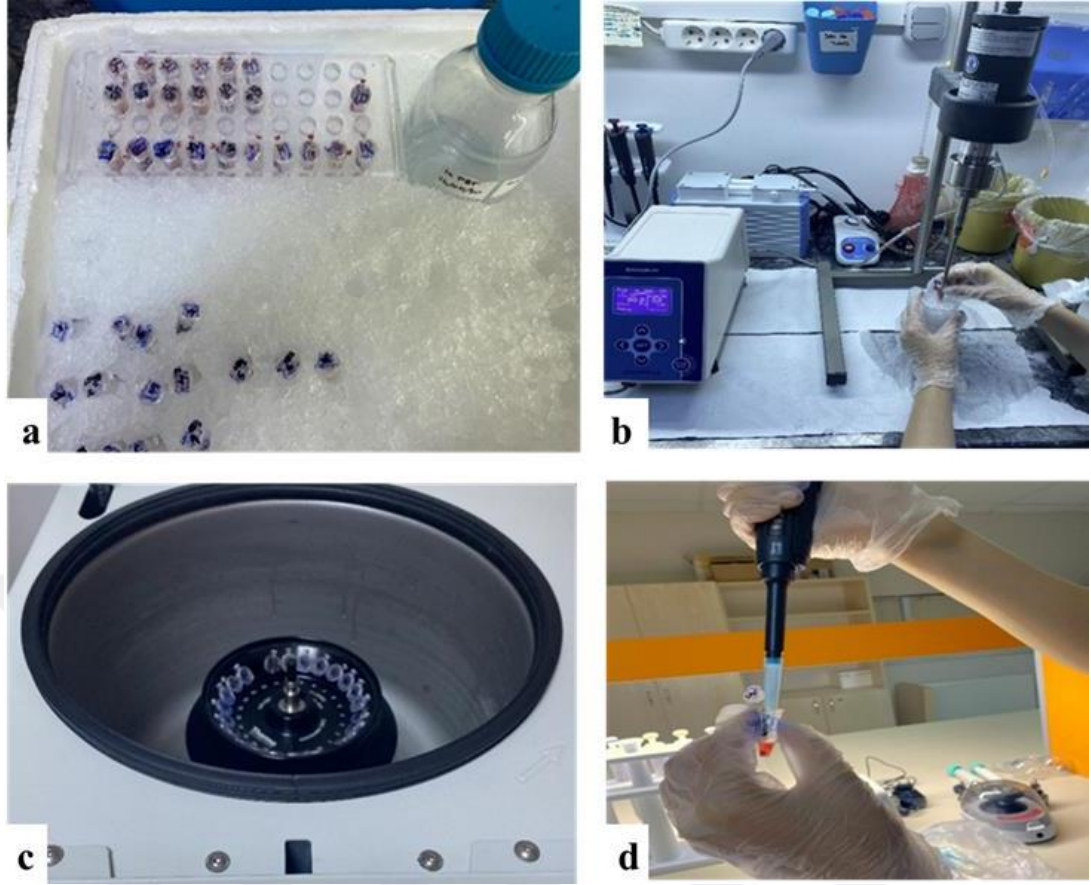
düzeylerinin incelenmesi için yapılacak olan immünoablottlama ve ELISA analizlerinde kullanılacak olan örnekler çalışma gününe kadar -80°C 'de saklandı.



Resim 3.10. Formaldehit içeren steril kaplara yerleştirilen fetal beyin ve plasenta örnekleri.

3.4.5. Dokuların Homojenizasyonu

Sakrifiye edilen ratlara ait fetal beyin ve plasenta dokuları 50-100 mg aralığında olacak şekilde parçalara ayrıldı, hassas terazide tartıldı ve temiz ependorf tüplerine yerleştirildi. Ardından 1:10 oranında soğuk PBS eklenerek prob sonikatör cihazı yardımıyla sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Sonikasyon işlemini takiben her bir örnek vorteks cihazı yardımıyla homojen hale getirildi ve buz üzerinde 10 dakika boyunca bekletildi. Bu işlemi takiben 14.000 r.p.m.'de 20 dakika boyunca $+40^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından her bir örneğe ait supernatantlar ayrı ependorf tüplerine aktarıldı ve örnekler -80°C 'de saklandı (Resim 3.11).



Resim 3.11. Dokulara soğuk a) PBS eklenerek homojenize edilmesi, b) sonikasyon işlemi, c) santrifüj işlemi ile süpernatantın ayrıştırılması, d) süpernatant toplanması.

3.4.6. LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi) Analizi

3.4.6.1. CBD Analizi İçin Ekstraksiyon Metodu

CBD uygulanan gebe ratlara ait numunelerde CBD miktarı analizi (192) 'in belirttiği yöntemle göre UHPLC-MS/MS cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemle göre, homojenize edilmiş 1 ml numune, içerisinde %0.1 (v/v) formik asit bulunan 1 ml metanol/asetonitril (50/50) çözeltisi ile ekstrakte edildi. Karışım 5 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4°C de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0.2 µm politetrafloroetilen (PTFE) membran filtreden geçirildikten sonra UHPLC-MS/MS cihazına enjekte edildi. Analiz süresi toplam 10 dakika olarak ayarlandı.

3.4.6.2. Cihaz Bilgileri

CBD analizi ve tespiti Thermo Scientific Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific-TSQ Fortis (Thermo Fisher Scientific) sistemi ile gerçekleştirildi. Kromatografik değerlendirmeler Xcalibur yazılımı kullanılarak yapıldı. Kromatografik ayırım için analitik kolon olarak Hypersil Gold RP C18 (1.9 μ m), 50x2.1 mm, (Thermo Fisher Scientific) UHPLC kolonu kullanıldı.

Tablo 3.3. LC-MS/MS işleminde kullanılan kolona ait bilgiler ve analiz parametreleri.

Kolon	Hypersil GOLD RP C18 (1.9 μ m), 50x2.1 mm
Kolon fırın sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon hacmi	10 μ L
Kapiler sıcaklığı	270 °C
Buharlaştırma sıcaklığı	50 °C
Auxiliary gaz basıncı (Arb)	20
Sheath gaz basıncı (Arb)	50
Sprey Voltaj (V)	$\pm$ 3500

3.4.6.3. Kullanılan Mobil Fazlar

Mobil faz A ve mobil faz B olmak üzere iki ayrı mobil faz çözeltisi hazırlanarak analitik kolondan (organik bazlı ve inorganik bazlı) gradiyent akış programı uygulanarak analizler gerçekleştirildi. Sistemdeki mevcut kütle dedektörü sıralı kuadrupol spektrometresidir ve 3 adet birbiri ardına sıralanmış kuadrupol kombinasyonu ile çalışmaktadır. Kullanılan iyonizasyon tekniği soft iyonizasyon olarak nitelendirilmekte ve genelde analitin ana kütlelerinin korunması ilkesine dayanmaktadır. Genellikle ana kütleye bir proton verilmesi (M^{+1}) ile pozitif iyonlaşma veya ana kütleden bir proton alınması (M^{-1}) ile negatif iyonlaşma esasına göre çalışmaktadır. LC-MS/MS cihazında CBD analitinin pozitif iyonlaşma modu ile 2 farklı kütle geçişi kullanılarak analizi gerçekleştirildi ve Tablo 3.4’de ayrıntılı bilgi sunuldu. Konsantrasyonu bilinen CBD saf standardı 3 farklı konsantrasyonda (0 mg/kg, 0.05 mg/kg ve 0.1 mg/kg) hazırlanarak analiz edildi ve cihazdan elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Gebe ratlara ait fetal beyin ve plasenta

örneklerinin analizi sonucu cihazdan elde edilen veriler kıyaslanarak kantitatif sonuçlara ulaşıldı.

Mobil faz A: Su:Asetonitril 95:5, 0.1% formik asit, 4 mM amonyum format

Mobil faz B: Asetonitril:Su 95:5, 0.1% formik asit, 4 mM amonyum format

Tablo 3.4. Cihazın SRM (selected reaction monitoring) bilgisi.

<i>Analit</i>	<i>Kısaltması</i>	<i>Moleküler ağırlığı</i>	<i>İzleme iyonu (m/z)</i>	<i>Tüp Lens gerilimi (V)</i>	<i>Çarpışma enerjisi (eV)</i>	<i>Kalibrasyon aralığı</i>
Kannabidiol	CBD	314	315.2>135.1	80	25	0-0.1 mg/kg
			315.2>193.1	75	20	0-0.1 mg/kg



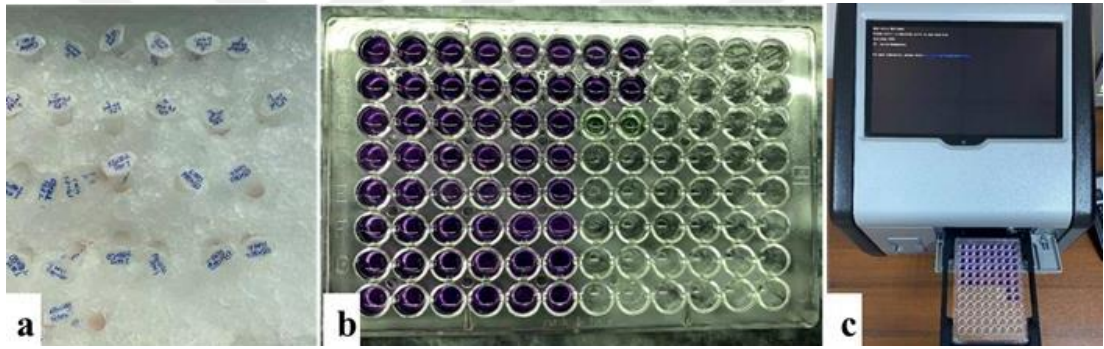
Resim 3.12. Kullanılan LC-MS/MS cihazın görünümü.

3.4.7. İmmünoiblamlama (Western Blot)

3.4.7.1 Total Protein İzolasyonu ve BCA Analizi

Protein izolasyonu için sonikasyon işlemi sonrası alınan fetal beyin ve plasenta dokularına ait süpernatant kısımları buz üzerine alındı. Örnekler ağırlıklarına oranla 2.5 kat olacak şekilde eş miktar proteaz inhibitörü içeren 2xRIPA tamponu ve PBS eklenerek dokular sonikasyon işlemi ile lize edildi. Lizis işlemini takiben örnekler vortek yardımıyla homojenize edilerek buz üzerinde 10 dakika

inkübe edildi. Takiben +4°C’de 14.000 r.p.m.’de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek ve süpernatant ayrıştırılarak yeni eppendorf tüplerine aktarıldı. Örneklerdeki total protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanılarak tayin edildi. Öncelikle 96 kuyucuklu mikrolakanın her bir kuyucuğuna 8 µL distile su ilave edildi. Her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde protein örneklerinde 2’şer µL kuyucuklara mikropipet yardımıyla aktarıldı. Kör olarak lizatlama tamponu kullanıldı. Daha sonra BCA çalışma reaktifinden 200 µL kuyucuklara eklendi ve mikrolaka streç filmle sarılarak 10 dakika 37°C’ye ısıtılmış olan etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 562 nm’de BioTek Epoch™ 2 mikrolaka cihazında ölçüm gerçekleştirildi. Absorbans değerlerinin ortalaması alındıktan sonra, BSA kullanılarak hazırlanan standart çözelti ile çizilen doğru denkleminde absorbans değerleri girilerek örneklerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı (Resim 3.13.).



Resim 3.13. Dokulardan izole edilen protein örneklerinin BCA yöntemi ile total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi.

3.4.7.2. Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamit Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Numunelerimizdeki proteinleri moleküler ağırlığına göre ayırtmak amacıyla sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroföresi (SDS-PAGE) metodu kullanıldı. Bu amaçla %12-15’lik jeller hazırlanarak proteinler ayırtıldı. Tipik olarak, çalışmalarımızda 30-40 µg toplam protein içeriği kullanıldı. SDS-PAGE içeriği Tablo 3.5.’te verilmiştir.

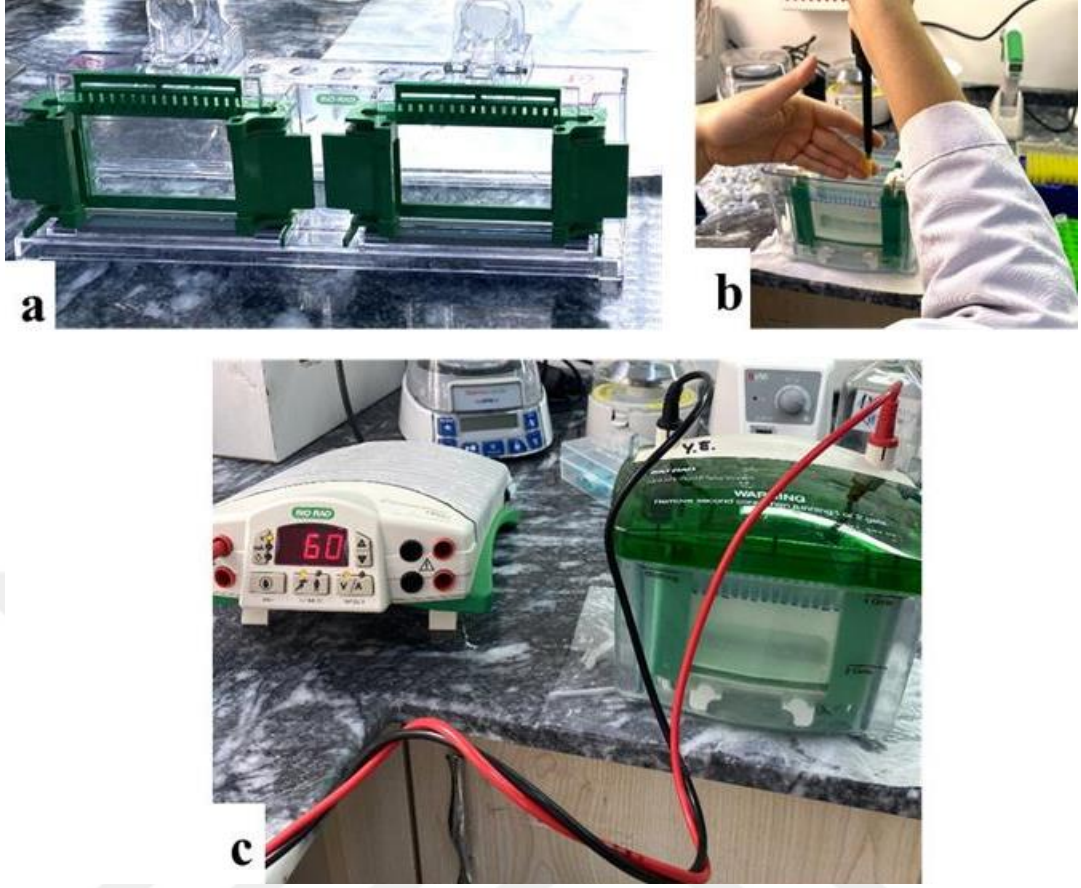
Tablo 3.5. SDS-PAGE ayırma ve yığınlama jellerinin hazırlanması.

4X AYIRMA JELİ	%12'lik 1 Jel (10 ml)	%15'lik 1 Jel (10ml)
%30 Akrilamit/bisakrilamit (29:1)	4 ml	5 ml
4X Ayırma tamponu	2.5 ml	2.5 ml
Distile su	3.5 ml	2.5 ml
%10'luk amonyum persülfat (AP)	75 µl	

4X YIĞINLAMA JELİ	%3.5'lik Jel (3 ml)
%30 Akrilamit/bisakrilamit (29:1)	0.35 ml
4X Ayırma tamponu	0.75 ml
Distile su	1.9 ml
%10'luk amonyum persülfat (AP)	25 µl

%12 ve %15'lik ayırma jelleri (Tablo 3.5.) hazırlandı ve jel dökme aparatı ile sabitlenen iki cam arasına döküldü. Jelin hava ile temasını engellemek için, üzeri alkol ile kaplandı. Ayırma jelinin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra jelin üst bölümü en az 5 kez dH₂O ile yıkandı ve kalan sıvı ise uzaklaştırıldı. Ayırma jelinin üzerine hazırlanan yığınlama jeli döküldü. Jelin üzerine kuyucukların oluşumunu sağlayan tarak yerleştirildi ve jelin polimerizasyonu beklendi. Jel polimerleştikten sonra aparattan çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

Yerleştirilen taraklar dikkatlice çıkarıldı. Protein örneklerinin 95°C'de 5 dakika boyunca 4x SDS-PAGE yükleme tamponu içerisinde denatüre edildi. Örneklerdeki protein içerikleri BCA hesaplamalarına göre eşitlenerek yaklaşık olarak 30-40 µg protein miktarına karşılık gelen lizat hacimlerinin üzerine dH₂O ve 4x yükleme tamponu eklenerek jellere yüklendi. Yükleme işlemi sonrasında 1x yürütme tamponu içerisinde 120V'de ~ 60 dakika süresince elektroforez işlemi uygulandı. Protein örnekleri jel üzerinde istenilen kademeye kadar yürütüldüğünde elektroforez işlemi sonlandırıldı ve transfer işlemi takip edildi (Resim 3.14.).



Resim 3.14. a) SDS-PAGE jelinin hazırlanması, b) protein örneklerinin jele yüklenmesi, c) elektroforez işleminin uygulanması.

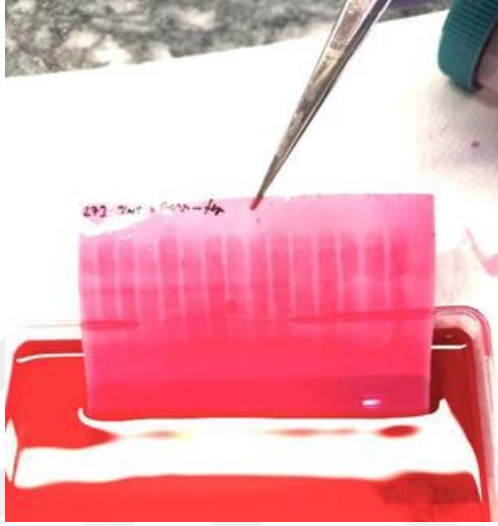
3.4.7.3. Ayrıştırılan Proteinlerin Membrana Transferi

İmmünoablottlama çalışmalarında kullanmak üzere SDS-PAGE ile ayrıştırılan protein örnekleri poliviniliden florür (PVDF) membrana transfer edildi. Bu amaçla 1X Transfer tamponu içerisinde 200 mA’de 120 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

PVDF Membrana Transfer, Western-blot sandviç aparatının içine sırasıyla bir sünger, Whatman kâğıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, Whatman kâğıdı ve bir sünger yerleştirilerek aparat hazır hale getirildi. PVDF membran, aparat içine yerleştirilmeden önce metanol içinde ıslatıldı. Oluşturulan sandviç aparatı, jeldeki proteinlerin membrana transfer edilebilmesi için transfer tankına yerleştirildi. Transfer aparatının içerisine 1X Transfer tamponu eklendi ve aparatın kenarlarına soğutucu bloklar yerleştirildi. Transfer işlemi, buz içerisinde gömülü bir şekilde 120 dakika boyunca 200 mA’lik elektrik akımı akımı uygulanarak gerçekleştirildi.

3.4.7.4. Membrana Transfer Edilen Protein Örneklerinin Görüntülenmesi

Transfer verimliliğini kontrol etmek amacıyla transfer işlemi sonrasında PVDF membranı %0.2'lik Ponceau-S-staining solüsyonu ile boyandı (Resim 3.15.). Protein örneklerinin membrana transfer işleminin doğrulanması sonrasında immünoiblottama çalışmaları takip edildi.



Resim 3.15. PVDF membranına transfer olan proteinlerin Ponceau-S-staining solüsyonu ile boyanması.

3.4.7.5. Bloklama ve Primer Antikor ile İşaretleme

Western blotlama yöntemindeki en önemli nokta, incelenen protein ile kullanılan antikorlar arasındaki özgül etkileşimlerdir. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek için membrana transfer esnasında, protein bağlanmayan bölgelerin bloklanması gerekir. Bu amaçla 1X yıkama tamponu ile hazırlanan %5'lik süt çözeltisiyle membran oda sıcaklığında 20 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra membran 1X yıkama tamponu ile 5 dakika boyunca temizlenerek gece boyu primer antikor ile inkübe edildi. Çalışmalarda kullanılan primer antikorlar; pH'ı 7.4 olan %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X yıkama tamponunda hazırlandı ve koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyum azid eklerek +4°C'de saklandı. Antikorlar ve dilüsyon oranları Tablo 3.6.'da verildi.

Tablo 3.6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.

Primer Antikor Adı	Dilüsyon oranı
GFAP	1:1000
S100B	1:1000
NF-κB	1:1000
p(Ser536)-NF-κB	1:400
CREB	1:2500
Beta-actin	1:10000

3.4.7.6. Sekonder Antikor ile İşaretleme

Primer antikor muamelesinden sonra membran 1X yıkama tamponu ile 3 defa beşer dakika olacak şekilde yıkandı. Ardından membran daha önce kullanım oranı 1:5000 veya 1:10000 olarak optimize edilmiş HRP bağlı tavşan (rabbit) veya fare (mouse) sekonder antikorları ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Sekonder antikor solüsyonu olarak %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X yıkama tamponu kullanıldı. Sekonder antikor inkübasyonunun tamamlanması ile membran, 1X yıkama tamponu ile 3 defa beşer dakika yıkanarak görüntüleme aşamasına geçildi.

3.4.7.7. Kemilüminesans Görüntüleme

Orijin özgül HRP enzimi ile işaretli sekonder antikor uygulanmış membranların kemilüminesans görüntülemesi için 1:1 oranında Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad) kullanıldı. Membranlar hazırlanan substrat solüsyonuyla 1 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından cihazın tablasına yerleştirilerek görüntüleme süresi ayarlandı. Protein bantlarının yoğunluğu Image J yazılımı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi.

3.4.8. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

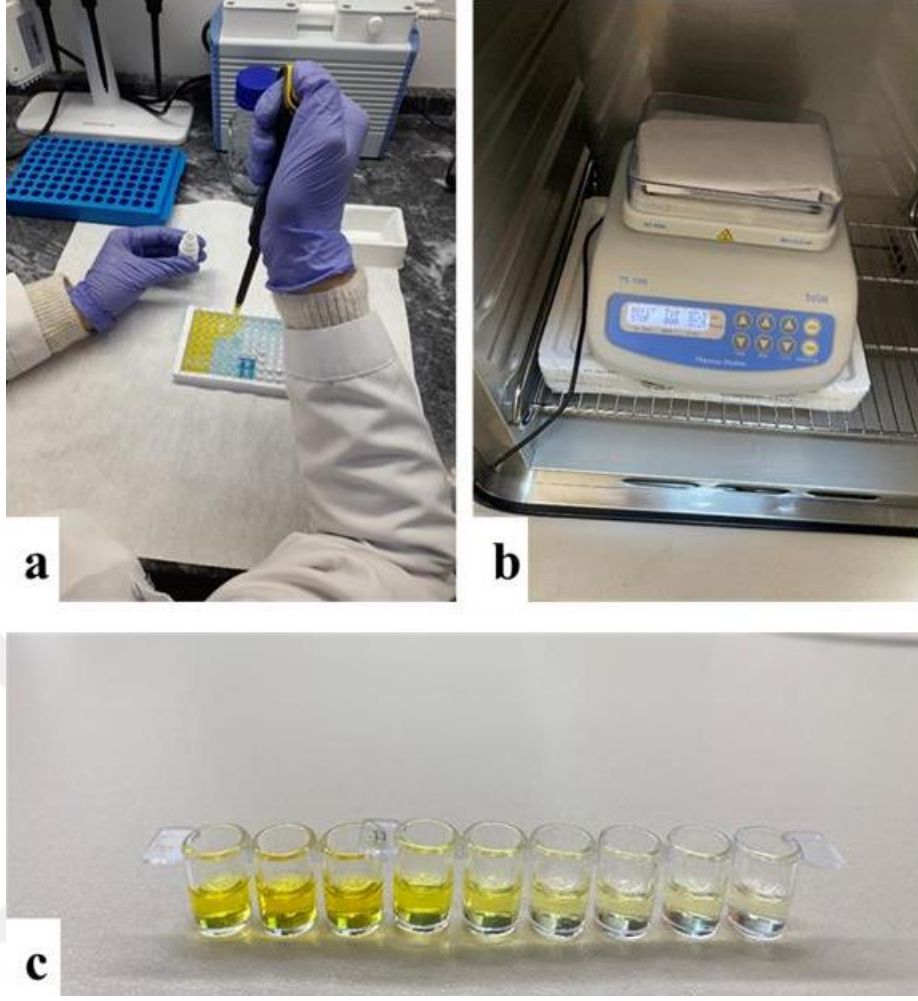
Fetal beyin dokularında IL-1β miktarları ELISA ticari kiti ile ölçüldü. ELISA işlemlerinde üretici firmanın talimatları takip edildi. Homojenizasyon öncesi tartılan dokulardan fazla kanı uzaklaştırmak için dokular soğuk PBS içerisinde yıkandı. Dokulara 1:10 (1 ml PBS içerisinde 10 mg doku olacak şekilde) seyreltme oranında

PBS eklenerek buz üzerinde ultrasonik parçalayıcı ile sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından homojenatlar $10.000 \times g$ 'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatantlar ayrı bir ependorfa alındı.

ELISA işleminde kullanılacak olan tüm kit bileşenleri ve numuneler çalışmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına alındı. Standartlar ve reaktifler hazırlandı, stok çözeltideki standart konsantrasyonu (2.000 pg/ml) ve stok çözelti 1.000 pg/ml'ye seyreltildi. Seyreltilmemiş standart en yüksek konsantrasyonlu standart olarak kullanıldı. Liyofilize olan standart "Sample Diluent" ile çözöldü. Takiben seri dilüsyon yolu ile standart konsantrasyonları 1.000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml ve 15.6 pg/ml'ye kadar seyreltildi. Ek olarak yalnızca "Sample Diluent" içeren 0 pg/ml'lik bir dilüsyon örneği daha eklendi. Böylelikle çalışmalarımızda 9 farklı standart grubu hazırlandı. Blank olarak PBS kullanıldı. Deteksiyon reaktifleri A ve B 100 kat seyreltildi ve yıkama solüsyonu 30X'ten 1X'e seyreltildi.

ELISA protokolünde aşağıdaki adımlar takip edildi;

Tüm reaktifler, numuneler ve standartlar hazırlandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µl standart veya numune eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. 100 µl önceden hazırlanmış deteksiyon reaktifi B eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonrasında tekrar sıvı uzaklaştırıldı ve 5 kez yıkama yapıldı. 90 µl substrat solüsyonu eklendi ve 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm'de mikropłaka okuyucuda ölçüm alındı. Standart örneklerin optik dansite (O.D.) değerleri kullanılarak oluşturulan grafik üzerindeki doğru denklemi kullanılarak örneklerimizdeki IL-1β düzeyleri hesaplandı (Resim 3.16.).



Resim 3.16. a) Standartların ve örneklerin kuyucuklara yüklenmesi, b) ELISA plate'inin inkübe edilmesi, c) standartlara ait görüntüler.

3.4.9. Histokimyasal Yöntemler

Rutin parafin takibi gerçekleştirilen fetal beyin ve plasenta dokularının parafin bloklarından alınan kesitler, HE boyama ve immünohistokimyasal analizler için kullanıldı.

Rutin parafin takibi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

Ratlardan alınan fetal beyin ve plasenta dokuları, formaldehit fiksativisi içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat boyunca fikse edildi. Fikse olan fetal beyin ve plasenta dokuları, süre sonunda dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100'lük EtOH'den) geçirildi. Alkol serilerindeki bekletme süreleri %70, %80 ve %90'luk EtOH'de birer gün; %100'lük EtOH'de ise 3 saat olarak gerçekleştirildi.

Dehidratasyondan sonra, alkol+ksilol karışımında 15 dakika ve sonrasında fetal beyin ve plasenta dokuları şeffaflaştırılmaları için saf ksilolde 15 dakika bekletildi. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi için dokular, sıvı parafinde 3 saat 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömülüp, parafin bloklar oluşturuldu. Parafin takibinden sonra 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, HE boyama ile rat fetal beyin ve plasenta dokularının histolojik yapılarının genel olarak değerlendirmeleri yapıldı ve ayrıca dokuların immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu da değerlendirildi.

3.4.9.1. Fetal Beyin ve Plasenta Dokularında Hematoksilen-Eozin Boyama

Fetal beyin ve plasenta dokularından alınan kesitlerde, HE boyaması aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi:

- Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60°C'lik fırında 3 saat bekletilerek, dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde tutunması sağlandı.
- Daha sonra, preparatlar sırasıyla ksilol I ve ksilol II'de 10'ar dakika bekletildi.
- Hidratasyon için preparatlar, azalan EtOH serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik EtOH) 10'ar dakika bekletildi.
- Preparatlar, 5 dakika distile sudan geçirildi.
- HE boyasında 3 dakika bekletildikten sonra preparatlar çeşme suyundan geçirildi ve süre sonunda eozin boyasında 2 dakika tutulduktan sonra tekrar çeşme suyundan geçirildi.
- HE boyamasından sonra, preparatların %70, %80, %90 ve %100'lük artan EtOH serilerine batır-çıkar yapılarak dehidratasyonları sağlandı.
- Son olarak ksilol I ve II'de 10'ar dakika tutulan preparatlar, Entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda fetal beyin ve plasenta dokularının genel histolojik yapıları ve immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu değerlendirildi.

3.4.10. İmmünohistokimyasal Yöntemler

Fetal beyin ve plasenta dokularından alınan kesitlerde TNF- α primer antikorunun immünohistokimyasal boyaması gerçekleştirildi. Yapılan boyama neticesinde, rat fetal beyin ve plasenta dokularında TNF- α düzeyleri ve hücrel yerleşimleri değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal analiz için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi;

- Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60°C'lik etüvde 1 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde tutunması sağlandı. Daha sonra, preparatlar 15'er dakika sırasıyla ksilol I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
- Preparatlar, azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik EtOH) 10 dakika bekletildikten sonra, 5 dakika distile sudan geçirildi.
- Antijen bölgelerinin açılması için preparatlar, sodyum sitrat solüsyonu (Citate Buffer 10x) 665 watt'a ayarlı mikrodalgada 5 dakika kaynatıldı ve soğuması için aynı solüsyon içinde buzdolabında +4°C'de 20 dakika bekletildi.
- Süre sonunda preparatlar PBS içinde 3 kez 5 dakika yıkandı.
- Takiben preparatlar metanol içinde hazırlanan %3'lük H₂O₂ içinde oda ısısında 20 dakika bekletilerek, endojen peroksidaz aktivitesi blokladı.
- Bloklama sonrasında preparatlar, PBS içinde 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı ve kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
- Yıkama sonrası, preparatlar sekonder antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek için TNF- α primer antikor damlatılacak kesitler UV bloklama solüsyonunda (Thermo Scientific, TP-125-HL) 10 dakika inkübe edildi.
- Bloklama sonrasında, yıkama yapılmadan kesitlerin üzerindeki UV bloklama solüsyonları dökülüp, primer antikor mikropipetle preparatlardaki kesitlerin üzerine damlatıldı.

- Primer antikor damlatılan preparatlar, gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Her immünohistokimya boyamasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanıldı ve negatif kontrol olarak izotip kontrol kullanıldı.
- Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları döküldü ve PBS’de 3 defa 10 dakika boyunca yıkandı.
- Sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Antibody (TP-125-BN), Thermo Scientific, UK) hazır solüsyon şeklinde kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Preparatlar, sekonder antikor aşamasından sonra PBS içinde 3 defa 5 dakika boyunca yıkandı.
- Yıkamadan sonra kesitlerin üzerinde streptavidin peroksidaz damlatılıp, oda ısında 20 dakika inkübasyonu gerçekleştirildi.
- Süre sonunda preparatlar, PBS içinde 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı.
- Yıkama sonrasında, kesitlerin üzerine 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve reaksiyon gelişimi ışık mikroskopunda kontrol edildi. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar PBS içine alınarak reaksiyon durduruldu ve ardından HE ile zıt boyama yapıldı.
- Son olarak preparatlar, artan alkol serilerinde (%70, %80, %90 ve %100 EtOH) dehidrate edilip, ksilolden geçirildikten sonra Entellan ile lamel kullanılarak kapatıldı. Kapatılan preparatlar, ışık mikroskopunda analiz edilerek; TNF- α primer antikorunun rat fetal beyin ve plasenta dokularındaki hücresel yerleşimleri ve göreceli ifade düzeyleri belirlendi.
- Deney ve kontrol gruplarına ait fetal beyin ve plasenta doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının yapmış oldukları skorlamaya (193) göre değerlendirildi (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Skorlama tablosu.

(-) skor	Negatif skor	Hiçbir yapısal değişikliğin olmadığını ifade etmektedir.
(+) skor	1 pozitif skor	Hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(++) skor	2 pozitif skor	Orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(+++) skor	3 pozitif skor	Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Fetal Beyin ve Plasenta Dokularında CBD Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çalışmamız kapsamında i.p. olarak dişi gebe ratlara uygulanan CBD'nin fetal beyin ve plasenta geçen konsantrasyonları LC-MS/MS cihazı ölçümüyle belirlendi (Tablo 4.1., Tablo 4.2., Şeki 4.1.). Fetal beyin dokularında, kontrol ve LPS gruplarına ait dokularda CBD saptanmadı. CBD uygulanan LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında, CBD dozlarıyla uyumlu şekilde dokularda saptanan CBD düzeyleri arasında paralellik olduğu belirlendi (32.1 ± 2.58 , 32.4 ± 4.03 , 52.8 ± 14.1 , sırasıyla).

Kontrol ve LPS grubuna kıyasla LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplar arasında ölçülen CBD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Elde edilen spektrumlar şekil 4.2.'de gösterildi.

LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplarda ölçülen CBD düzeylerindeki farklılıklar; uygulama dozuna bağlı olarak grup ortalaması düzeyinde artış göstermiş olmasına karşın, standart sapmalardaki düzensiz dağılımlar nedeniyle gruplar arasındaki ölçülen CBD düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4., Tablo 4.3.).

Plasenta dokularında kontrol ve LPS gruplarına ait dokularda CBD saptanmadı. CBD uygulanan LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında, CBD dozlarıyla uyumlu şekilde dokularda saptanan CBD düzeyleri arasında paralellik olduğu belirlendi (12.3 ± 1.11 , 12.5 ± 0.957 , 16.7 ± 6.17).

Kontrol ve LPS grubuna kıyasla LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplar arasında ölçülen CBD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Elde edilen spektrumlar Şekil 4.3.'te gösterildi.

LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplarda ölçülen CBD düzeylerindeki farklılıklar; uygulama dozuna

bağlı olarak grup ortalaması düzeyinde artış göstermiş olmasına karşın, standart sapmalardaki düzensiz dağılımlar nedeniyle gruplar arasındaki ölçülen CBD düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4., Tablo 4.4.).

Tablo 4.1. Fetal beyin dokularında LC-MS/MS cihazı ile ölçülen CBD miktarları.

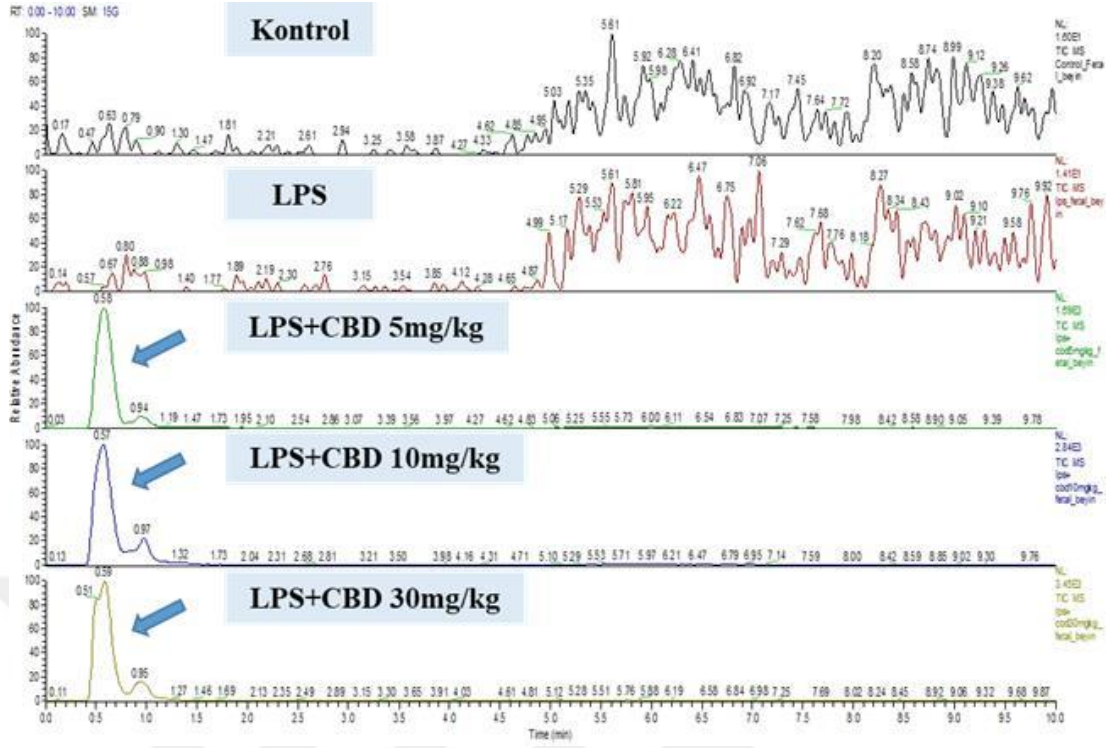
Gruplar (Fetal Beyin)	Ölçülen CBD Miktarı (ppm)	Ölçülen CBD Miktarı (ppb)
Kontrol (1)	0	0
Kontrol (2)	0	0
Kontrol (3)	0	0
Kontrol (4)	0	0
Kontrol (5)	0	0
Kontrol (6)	0	0
LPS (1)	0	0
LPS (2)	0	0
LPS (3)	0	0
LPS (4)	0	0
LPS (5)	0	0
LPS (6)	0	0
LPS+CBD 5mg/kg (1)	0.043	43
LPS+CBD 5mg/kg (2)	0.032	32
LPS+CBD 5mg/kg (3)	0.032	32
LPS+CBD 5mg/kg (4)	0.05	50
LPS+CBD 5mg/kg (5)	0.025	25
LPS+CBD 5mg/kg (6)	0.029	29
LPS+CBD 5mg/kg (7)	0.043	43
LPS+CBD 5mg/kg (8)	0.029	29
LPS+CBD 5mg/kg (9)	0.024	24
LPS+CBD 10mg/kg (1)	0.025	25
LPS+CBD 10mg/kg (2)	0.029	29
LPS+CBD 10mg/kg (3)	0.043	43
LPS+CBD 10mg/kg (4)	0.029	29
LPS+CBD 10mg/kg (5)	0.024	24
LPS+CBD 10mg/kg (6)	0.026	26
LPS+CBD 10mg/kg (7)	0.061	61
LPS+CBD 10mg/kg (8)	0.029	29
LPS+CBD 10mg/kg (9)	0.026	26
LPS+CBD 10mg/kg (10)	0.023	23
LPS+CBD 30mg/kg (1)	0.039	39
LPS+CBD 30mg/kg (2)	0.01	10
LPS+CBD 30mg/kg (3)	0.049	49
LPS+CBD 30mg/kg (4)	0.076	76
LPS+CBD 30mg/kg (5)	0.09	90

Tablo 4.2. Plasenta dokularında LC-MS/MS cihazı ile ölçülen CBD miktarları.

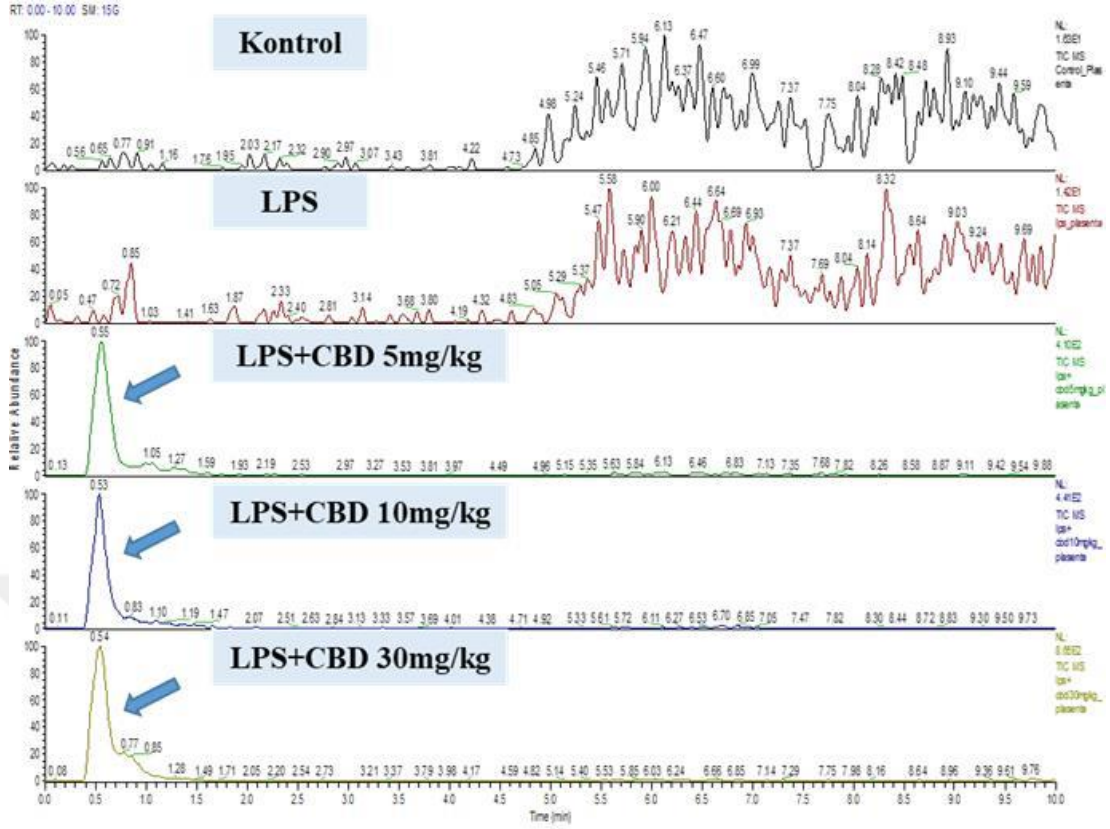
Gruplar (Plasenta)	Ölçülen CBD Miktarı (ppm)	Ölçülen CBD Miktarı (ppb)
Kontrol (1)	0	0
Kontrol (2)	0	0
Kontrol (3)	0	0
LPS (1)	0	0
LPS (2)	0	0
LPS (3)	0	0
LPS+CBD 5mg/kg (1)	0.015	15
LPS+CBD 5mg/kg (2)	0.013	13
LPS+CBD 5mg/kg (3)	0.011	11
LPS+CBD 5mg/kg (4)	0.015	15
LPS+CBD 5mg/kg (5)	0.01	10
LPS+CBD 5mg/kg (6)	0.015	15
LPS+CBD 10mg/kg (1)	0.01	10
LPS+CBD 10mg/kg (2)	0.014	14
LPS+CBD 10mg/kg (3)	0.012	12
LPS+CBD 10mg/kg (4)	0.01	10
LPS+CBD 10mg/kg (5)	0.014	14
LPS+CBD 10mg/kg (6)	0.01	10
LPS+CBD 30mg/kg (1)	0.01	10
LPS+CBD 30mg/kg (2)	0.011	11
LPS+CBD 30mg/kg (3)	0.029	29

File Name	Sample Type	Sample Name	Integration Type	Area	ISTD Area	Area Ratio	Specified Amount	Calculated Amount
CBD_Std_005ppm	Standard		Manual Integration	19042	NA	NA	0.050	0.051
CBD_Std_005ppm	Standard		Method Settings	18347	NA	NA	0.050	0.049
CBD_Std_01ppm	Standard		Manual Integration	46878	NA	NA	0.100	0.100
Control_1_Fetal	Unknown		Manual Integration	2360	NA	NA	NA	0.008
Control_1_Plasenta	Unknown		Method Settings	3	NA	NA	NA	0.000
Control_2_Fetal	Unknown		Method Settings	14	NA	NA	NA	0.000
Control_2_Plasenta	Unknown		Method Settings	2	NA	NA	NA	-0.000
Control_3_Fetal	Unknown		Method Settings	3	NA	NA	NA	0.000
Control_3_Plasenta	Standard		Method Settings	3	NA	NA	0.000	0.000
Control_4_Fetal	Unknown		Method Settings	2	NA	NA	NA	-0.000
Control_4_Plasenta	Unknown		Method Settings	3	NA	NA	NA	-0.000
Control_5_Fetal	Unknown		Method Settings	3	NA	NA	NA	-0.000
Control_6_Fetal	Unknown		Method Settings	22	NA	NA	NA	0.000
Control_6_Fetal	Unknown		Method Settings	1	NA	NA	NA	-0.000
LPS_1_Fetal	Unknown		Manual Integration	20	NA	NA	NA	0.000
LPS_1_Plasenta	Unknown		Manual Integration	4	NA	NA	NA	0.000
LPS_2_Fetal	Unknown		Manual Integration	4	NA	NA	NA	0.000
LPS_2_Plasenta	Unknown		Manual Integration	1	NA	NA	NA	-0.000
LPS_3_Fetal	Unknown		Manual Integration	11	NA	NA	NA	0.000
LPS_3_Plasenta	Unknown		Manual Integration	10	NA	NA	NA	0.000
LPS_4_Fetal	Unknown		Manual Integration	10	NA	NA	NA	0.000
LPS_5_Fetal	Unknown		Manual Integration	14	NA	NA	NA	0.000
LPS_6_Fetal	Unknown		Manual Integration	8	NA	NA	NA	0.000
LPS_CBD1_1_Fetal_Part1	Unknown		Manual Integration	15624	NA	NA	NA	0.043
LPS_CBD1_1_Fetal_Part2	Unknown		Manual Integration	8168	NA	NA	NA	0.025
LPS_CBD1_1_Plasenta_Part1	Unknown		Manual Integration	4539	NA	NA	NA	0.015
LPS_CBD1_1_Plasenta_Part2	Unknown		Manual Integration	4596	NA	NA	NA	0.015
LPS_CBD1_2_Fetal_Part1	Unknown		Manual Integration	11056	NA	NA	NA	0.032
LPS_CBD1_2_Fetal_Part2	Unknown		Manual Integration	9850	NA	NA	NA	0.029
LPS_CBD1_2_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	4081	NA	NA	NA	0.013
LPS_CBD1_2_Plasenta_Part2	Unknown		Method Settings	2897	NA	NA	NA	0.010
LPS_CBD1_3_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	11061	NA	NA	NA	0.032
LPS_CBD1_3_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	15354	NA	NA	NA	0.043
LPS_CBD1_3_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	3380	NA	NA	NA	0.011
LPS_CBD1_3_Plasenta_Part2	Unknown		Method Settings	4574	NA	NA	NA	0.015
LPS_CBD1_4_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	18503	NA	NA	NA	0.050
LPS_CBD1_4_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	9769	NA	NA	NA	0.029
LPS_CBD1_5_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	7668	NA	NA	NA	0.024
LPS_CBD2_1_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	26555	NA	NA	NA	0.066
LPS_CBD2_1_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	8440	NA	NA	NA	0.026
LPS_CBD2_1_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	3082	NA	NA	NA	0.010
LPS_CBD2_1_Plasenta_Part2	Unknown		Method Settings	3137	NA	NA	NA	0.010
LPS_CBD2_2_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	9288	NA	NA	NA	0.028
LPS_CBD2_2_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	23833	NA	NA	NA	0.061
LPS_CBD2_2_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	4212	NA	NA	NA	0.014
LPS_CBD2_2_Plasenta_Part2	Unknown		Method Settings	4294	NA	NA	NA	0.014
LPS_CBD2_3_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	5361	NA	NA	NA	0.017
LPS_CBD2_3_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	9748	NA	NA	NA	0.029
LPS_CBD2_3_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	3545	NA	NA	NA	0.012
LPS_CBD2_3_Plasenta_Part2	Unknown		Method Settings	3032	NA	NA	NA	0.010
LPS_CBD2_4_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	32993	NA	NA	NA	0.077
LPS_CBD2_4_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	8407	NA	NA	NA	0.026
LPS_CBD2_5_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	18042	NA	NA	NA	0.049
LPS_CBD2_5_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	7392	NA	NA	NA	0.023
LPS_CBD2_6_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	12114	NA	NA	NA	0.035
LPS_CBD2_7_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	10048	NA	NA	NA	0.030
LPS_CBD3_1_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	13703	NA	NA	NA	0.039
LPS_CBD3_1_Fetal_Part2	Unknown		Method Settings	40671	NA	NA	NA	0.090
LPS_CBD3_1_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	3008	NA	NA	NA	0.010
LPS_CBD3_2_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	6760	NA	NA	NA	0.021
LPS_CBD3_2_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	3441	NA	NA	NA	0.011
LPS_CBD3_3_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	18347	NA	NA	NA	0.049
LPS_CBD3_3_Plasenta_Part1	Unknown		Method Settings	9557	NA	NA	NA	0.029
LPS_CBD3_4_Fetal_Part1	Unknown		Method Settings	32304	NA	NA	NA	0.076

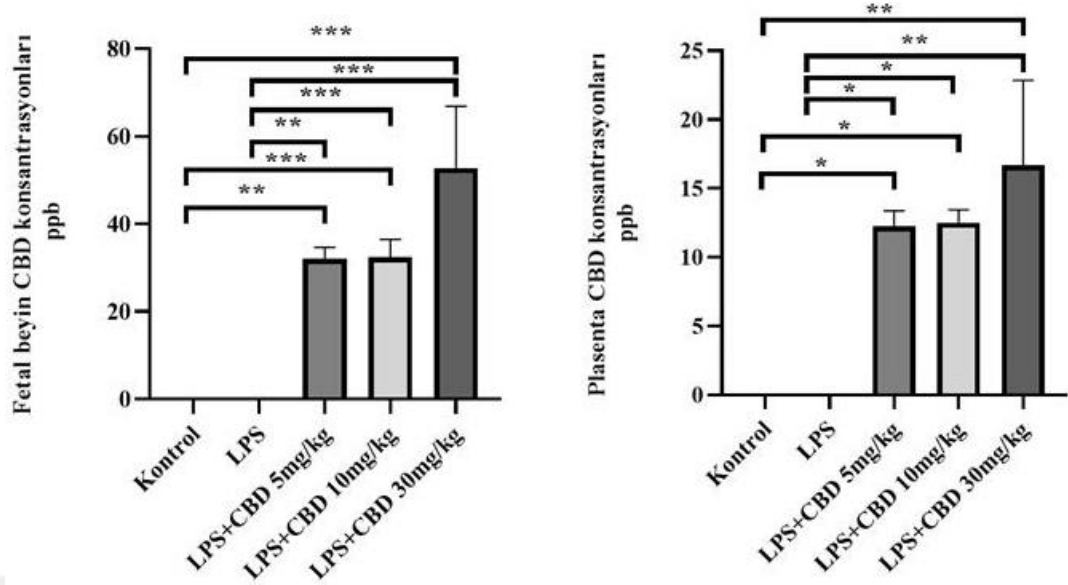
Şekil 4.1. LC-MS/MS cihazına ilişkin veri çıktısı.



Şekil 4.2. Fetal beyin dokularına ait CBD spektrumları (1. Spektrum; kontrol, 2. spektrum; LPS, 3. spektrum; LPS+CBD 5mg/kg, 4. spektrum; LPS+CBD 10mg/kg, 5. spektrum; LPS+CBD 30mg/kg gruplarına aittir ve CBD spektrumları siyah ok ile gösterilmiştir).



Şekil 4.3. Plasenta dokularına ait CBD spektrumları (1. Spektrum; kontrol, 2. spektrum; LPS, 3. spektrum; LPS+CBD 5mg/kg, 4. spektrum; LPS+CBD 10mg/kg, 5. spektrum; LPS+CBD 30mg/kg gruplarına aittir ve CBD spektrumları siyah ok ile gösterilmiştir).



Şekil 4.4. LC-MS/MS ölçümü sonucunda, kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına fetal beyin ve plasenta dokularında saptanan CBD konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$.

Tablo 4.3. Fetal beyin dokularında kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında saptanan ortalama CBD konsantrasyonları, $\pm$ SEM ve p değerlerine ilişkin değerler (a; kontrol grubu ile istatistiksel anlamlılığın kıyaslamasını, b; LPS grubu ile istatistiksel anlamlılığın kıyaslamasını göstermektedir). One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı.

Gruplar	Fetal Beyin Ortalama CBD Konsantrasyonu (ppb)	$\pm$ SEM	p değeri
Kontrol	0	0	$>0.999^b$
LPS	0	0	$>0.999^a$
LPS+CBD 5mg/kg	32.1	2.58	$0.0015^{a,b}$
LPS+CBD 10mg/kg	32.4	4.03	$0.0015^{a,b}$
LPS+CBD 30mg/kg	52.8	14.1	$<0.0001^{a,b}$

Tablo 4.4. Plasenta dokularında kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında saptanan ortalama CBD konsantrasyonları, $\pm$ SEM ve *p* değerlerine ilişkin değerler (a; kontrol grubu ile istatistiksel anlamlılık kıyaslamalarını, b; LPS grubu ile istatistiksel anlamlılık kıyaslamalarını göstermektedir). One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı.

Gruplar	Plasenta Ortalama CBD Konsantrasyonu (ppb)	$\pm$ SEM	<i>p</i> değeri
Kontrol	0	0	>0.999 ^b
LPS	0	0	>0.999 ^a
LPS+CBD 5mg/kg	12.3	1.11	0.0302 ^{a,b}
LPS+CBD 10mg/kg	12.5	0.957	0.0267 ^{a,b}
LPS+CBD 30mg/kg	16.7	6.17	0.0060 ^{a,b}

4.2. İmmünoblotlama ile p(Ser536)-NF- κ B, NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB Proteinlerinin İfade Düzeylerinin Fetal Beyin Dokusunda Belirlenmesi

NF- κ B protein ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla LPS grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.5., Tablo 4.5.). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında LPS grubuna kıyasla NF- κ B protein ifade düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.6., Tablo 4.5.).

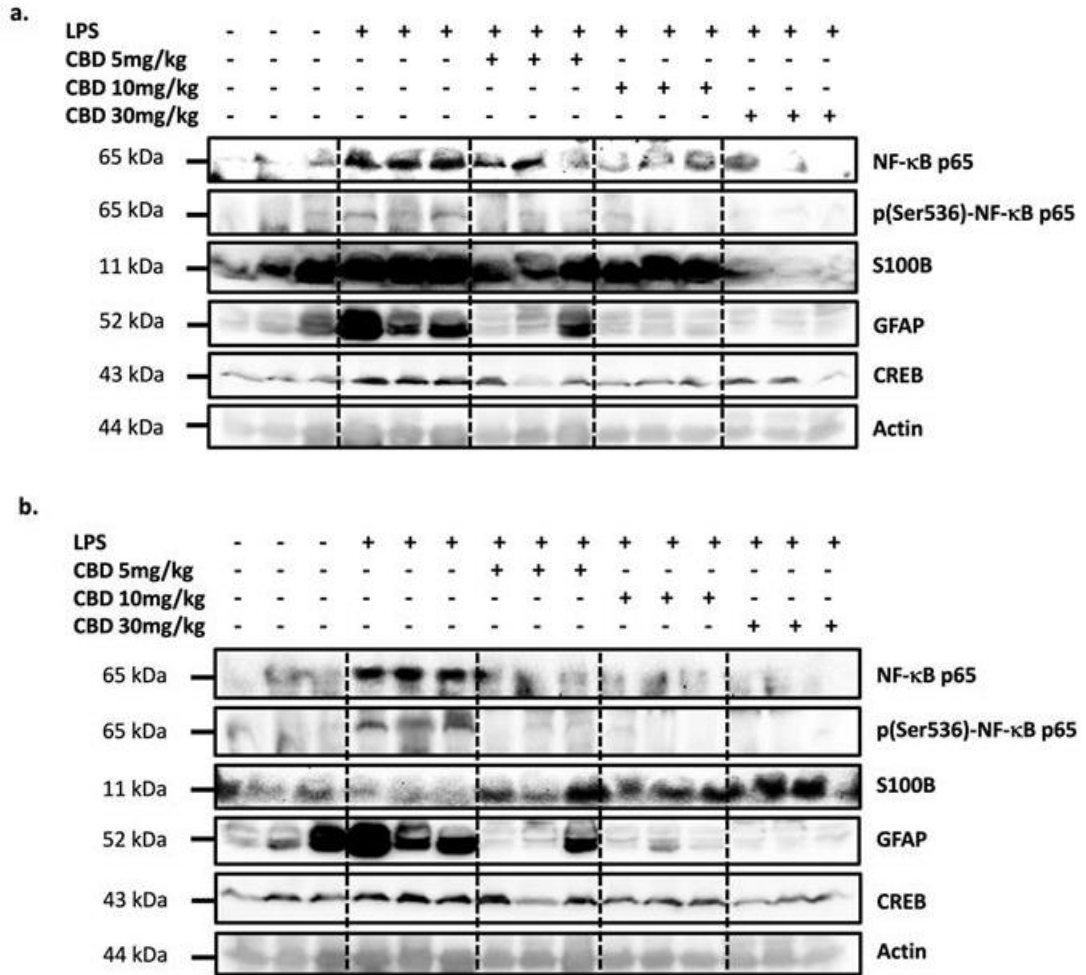
Fosforile p-(Ser536)-NF- κ B protein ifadesi düzeyleri LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.5., Tablo 4.5.). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplarda LPS grubuna kıyasla p-(Ser536)-NF- κ B düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azaldığı belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.6., Tablo 4.5.).

S100B protein ifadesinin değerlendirildiği immünoblotlama görüntülerinden yapılan dansitometrik analizlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Tablo 4.5.).

GFAP protein ifadesinin değerlendirildiği çalışmalarda LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış olduğu belirlendi ($p<0.01$)

(Şekil 4.5., Tablo 4.5.). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında LPS grubuna kıyasla GFAP protein ifadesi düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.001$) (Şekil 4.6., Tablo 4.5.).

CREB protein ifade düzeylerinde LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.5., Tablo 4.5.). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.01$) (Şekil 4.6., Tablo 4.5.).



Şekil 4.5. Kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına ait fetal beyin dokularında p(Ser536)-NF-κB, NF-κB, GFAP, S100B ve CREB protein düzeylerinin immünoiblottlama ile incelenmesi. Çalışmalarda beta-actin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. ($n=6$)

Tablo 4.5. Fetal beyin dokularında kontrol, LPS, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında belirlenen p(Ser536)-NF- κ B, NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB protein kat artışlarının ortalama, $\pm$ SEM ve *p* değerlerine ilişkin değerler (a; kontrol grubu ile istatistiksel anlamlılık kıyaslamalarını, b; LPS grubu ile istatistiksel anlamlılık kıyaslamalarını göstermektedir). One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı.

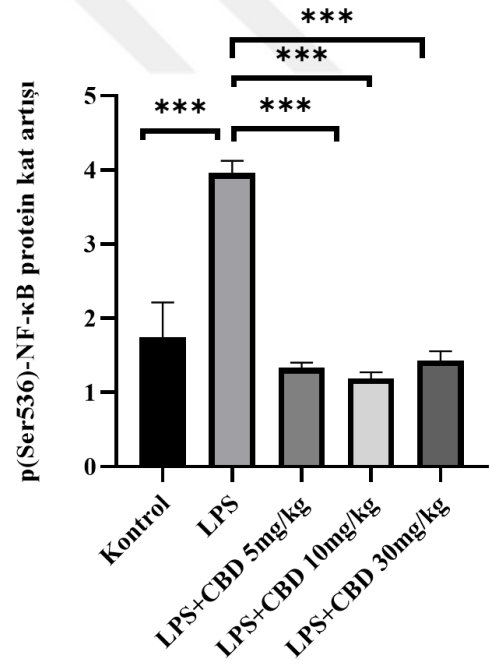
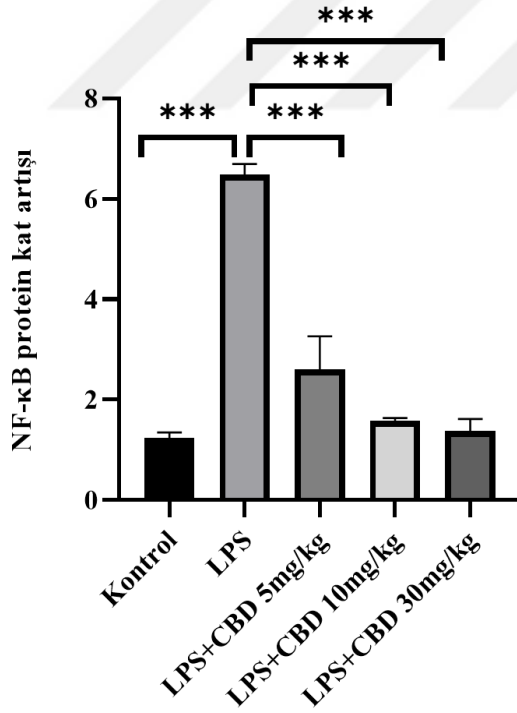
Gruplar	NF- κ B protein kat artışı ortalaması	$\pm$ SEM	<i>p</i> değeri
Kontrol	1.2	0.10	<0.0001 ^b
LPS	6.5	0.21	<0.0001 ^a
LPS+CBD 5mg/kg	2.6	0.65	0.0499 ^a
LPS+CBD 10mg/kg	1.6	0.063	<0.0001 ^b
LPS+CBD 30mg/kg	1.4	0.24	<0.0001 ^b

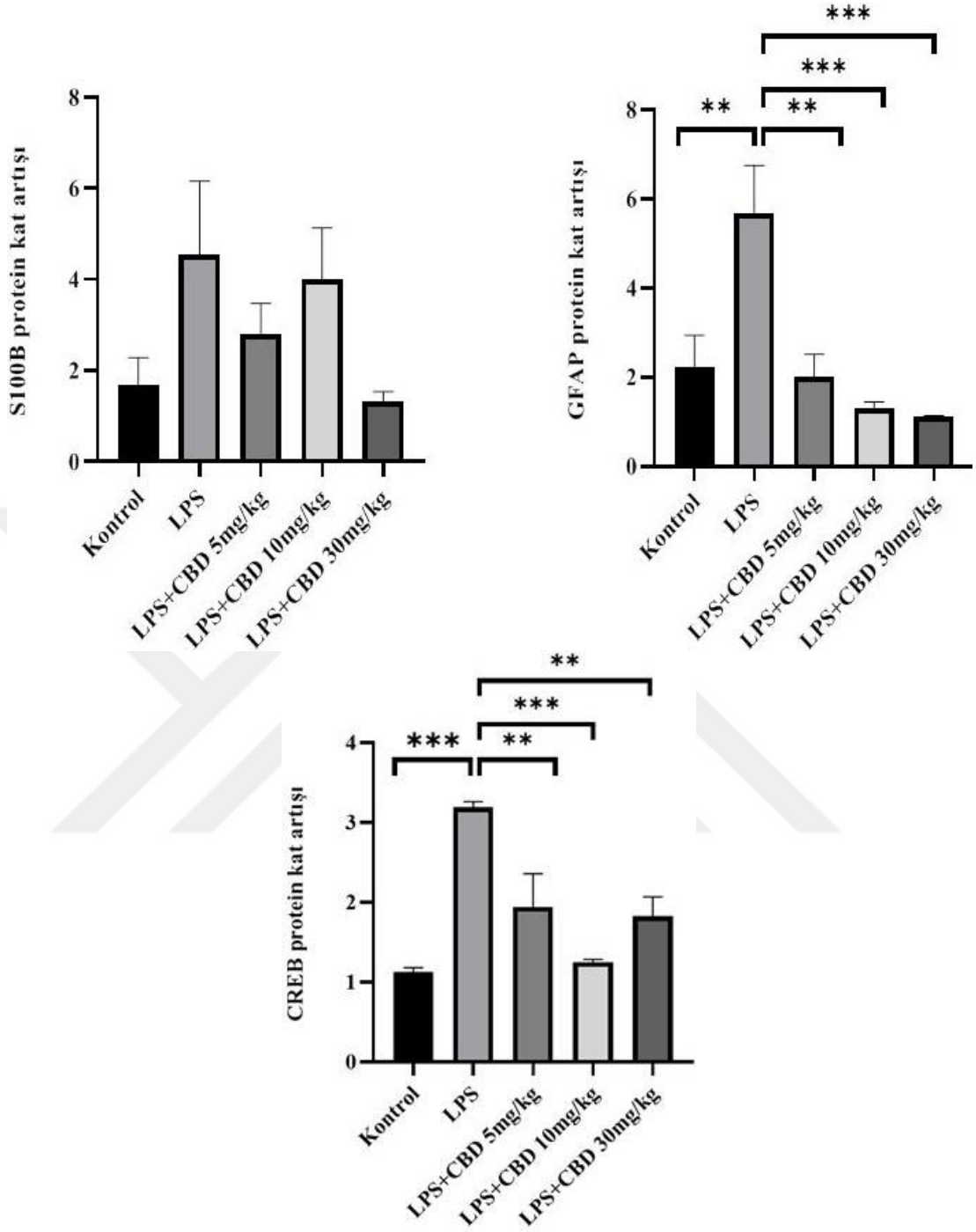
Gruplar	p(Ser536)-NF- κ B protein kat artışı ortalaması	$\pm$ SEM	<i>p</i> değeri
Kontrol	1.7	0.47	<0.0001 ^b
LPS	4	0.17	<0.0001 ^a
LPS+CBD 5mg/kg	1.3	0.071	<0.0001 ^b
LPS+CBD 10mg/kg	1.2	0.08	<0.0001 ^b
LPS+CBD 30mg/kg	1.4	0.13	<0.0001 ^b

Gruplar	S100B protein kat artışı ortalaması	$\pm$ SEM	<i>p</i> değeri
Kontrol	1.7	0.6	ns ^b
LPS	4.5	1.6	ns ^a
LPS+CBD 5mg/kg	2.8	0.66	ns ^{a,b}
LPS+CBD 10mg/kg	4.0	1.1	ns ^{a,b}
LPS+CBD 30mg/kg	1.3	0.23	ns ^{a,b}

Gruplar	GFAP protein kat artışı ortalaması	± SEM	p değeri
Kontrol	2.2	0.71	0.0056 ^b
LPS	5.7	1.1	0.0056 ^a
LPS+CBD 5mg/kg	2.0	0.5	0.0031 ^b
LPS+CBD 10mg/kg	1.3	0.13	0.0004 ^b
LPS+CBD 30mg/kg	1.1	0.015	0.0002 ^b

Gruplar	CREB protein kat artışı ortalaması	± SEM	p değeri
Kontrol	1.1	0.052	<0.0001 ^b
LPS	3.2	0.072	<0.0001 ^a
LPS+CBD 5mg/kg	1.9	0.42	0.0039 ^b
LPS+CBD 10mg/kg	1.3	0.034	<0.0001 ^b
LPS+CBD 30mg/kg	1.8	0.24	0.0015 ^b





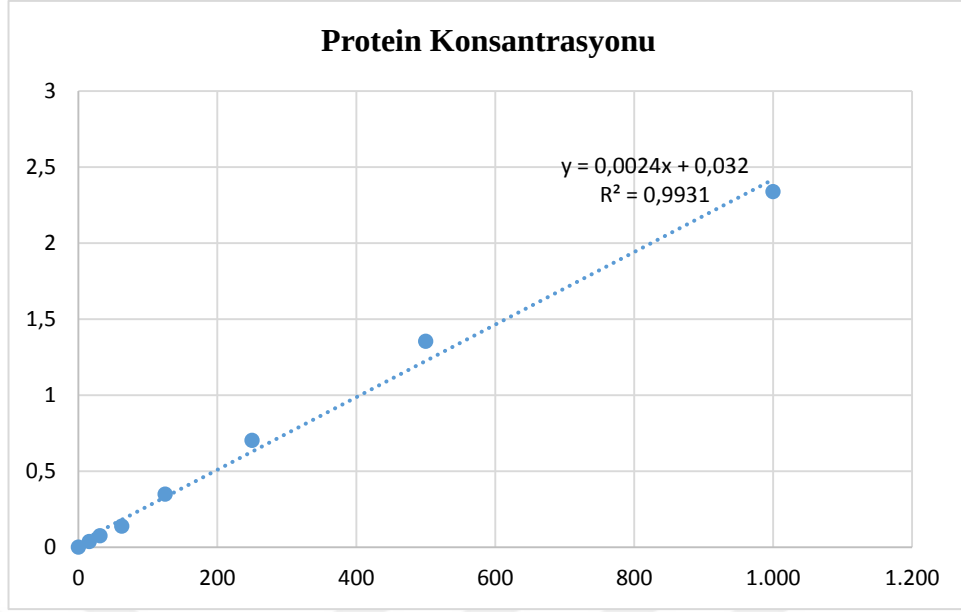
Şekil 4.6. Fetal beyin dokularında p(Ser536)-NF- κ B, NF- κ B, GFAP, S100B ve CREB protein ifadelerindeki değişimlerin kat artışı cinsinden grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p < 0.05$, '**' $p < 0.01$, '***' $p < 0.001$. ($n=6$)

4.3. Fetal Beyin Dokularında IL-1 β Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla IL-1 β konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi. LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında incelenen IL-1 β düzeyleri LPS grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0.05$, $p<0.001$) (Şekil 4.8, Tablo 4.7.). CBD uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise LPS+CBD 30mg/kg grubunda IL-1 β konsantrasyonları LPS+CBD 5mg/kg grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.8, Tablo 4.7.). LPS+CBD 30mg/kg grubunda ölçülen IL-1 β düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.8, Tablo 4.7.). Gruplara ait ortalama O.D. değerleri ve belirlenen IL-1 β konsantrasyonlarına ait veriler Tablo 4.7.'de verildi.

Tablo 4.6. Standartlara ait konsantrasyonlar ve O.D. değerleri.

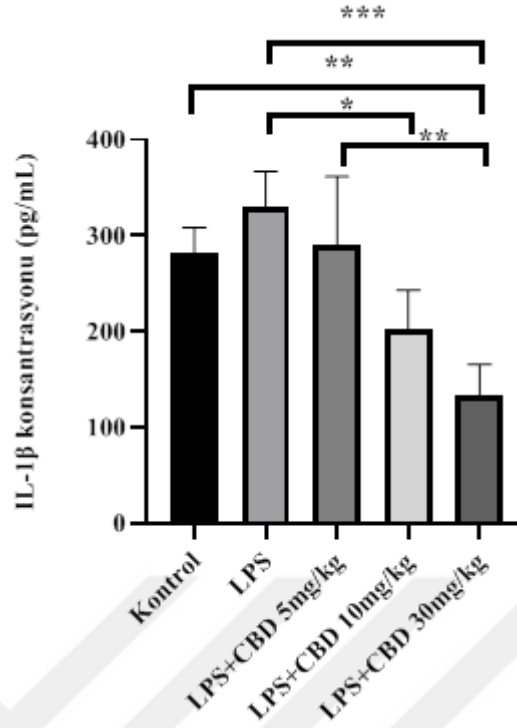
Protein konsantrasyonu (pg/mL)	O.D. (450 nm)
1,000	2.338
500	1.353
250	0.7015
125	0.3485
62.5	0.138
31.2	0.075
15.6	0.037
0	0



Şekil 4.7. Standart eğrisi.

Tablo 4.7. Fetal beyin dokularında deney gruplarına ait her gruptan bağımsız 3 örneğe ilişkin ortalama O.D. değerleri ve IL-1 β konsantrasyonları.

Gruplar	Ortalama O.D.	Ortalama protein konsantrasyonu (pg/mL) $\pm$ SEM
Kontrol	0.707	229.6354167 $\pm$ 13
LPS	0.825	278.7962963 $\pm$ 21
LPS+CBD 5mg/kg	0.730	187.8298611 $\pm$ 41
LPS+CBD 10mg/kg	0.516	150.2083333 $\pm$ 21
LPS+CBD 30mg/kg	0.251	81.28472222 $\pm$ 16



Şekil 4.8. Deney gruplarına ait IL-1 β konsantrasyonlarının (pg/ml) grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=3$)

4.4. Histopatolojik İncelemeler ve İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Fetal Beyin Dokularındaki Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları

Kontrol grubuna ait ratların HE boyamaları neticesinde fetal beyin dokularında herhangi bir histopatolojik bir bulguya rastlanmadı (Tablo 4.8., Resim 4.1., Şekil 4.9.). LPS grubuna ait örneklerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek konjesyon ve hemoraji bölgeleri görüldü ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla konjesyon ve hemoraji bölgeleri görülürken ($p<0.05$), LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında görülen artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmadı ($p>0.05$). Sadece en yüksek doz CBD dozunda (LPS+CBD 30mg/kg) LPS grubuna göre anlamlı düzeyde konjesyon ve hemoraji bölgelerinde azalma görüldü ($p<0.05$). Meninkslerde LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla büyük ölçüde hemoraji bölgeleri görüldü ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg uygulanan gruplarda az miktarda da olsa bu bölgelerde hemoraji görüldü ($p<0.05$). LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD

30mg/kg gruplarında kontrol grubuna kıyasla görülen artış anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Meninkslerde hemoraji bölgeleri LPS+CBD 30mg/kg grubunda LPS grubuna göre anlamlı ölçüde az yoğunlukta görüldü ($p<0.05$). Ayrıca kontrol ve LPS gruplarında kortekste ödem alanlarının değerlendirilmesinde iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin şekilde anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 10mg/kg gruplarında da kontrol grubuna kıyasla kortekste ödem alanlarında LPS grubuna göre daha az yoğunlukta olmakla birlikte anlamlı artış saptandı ($p<0.01$, $p<0.05$) (Tablo 4.8., Resim 4.1., Şekil 4.9.).

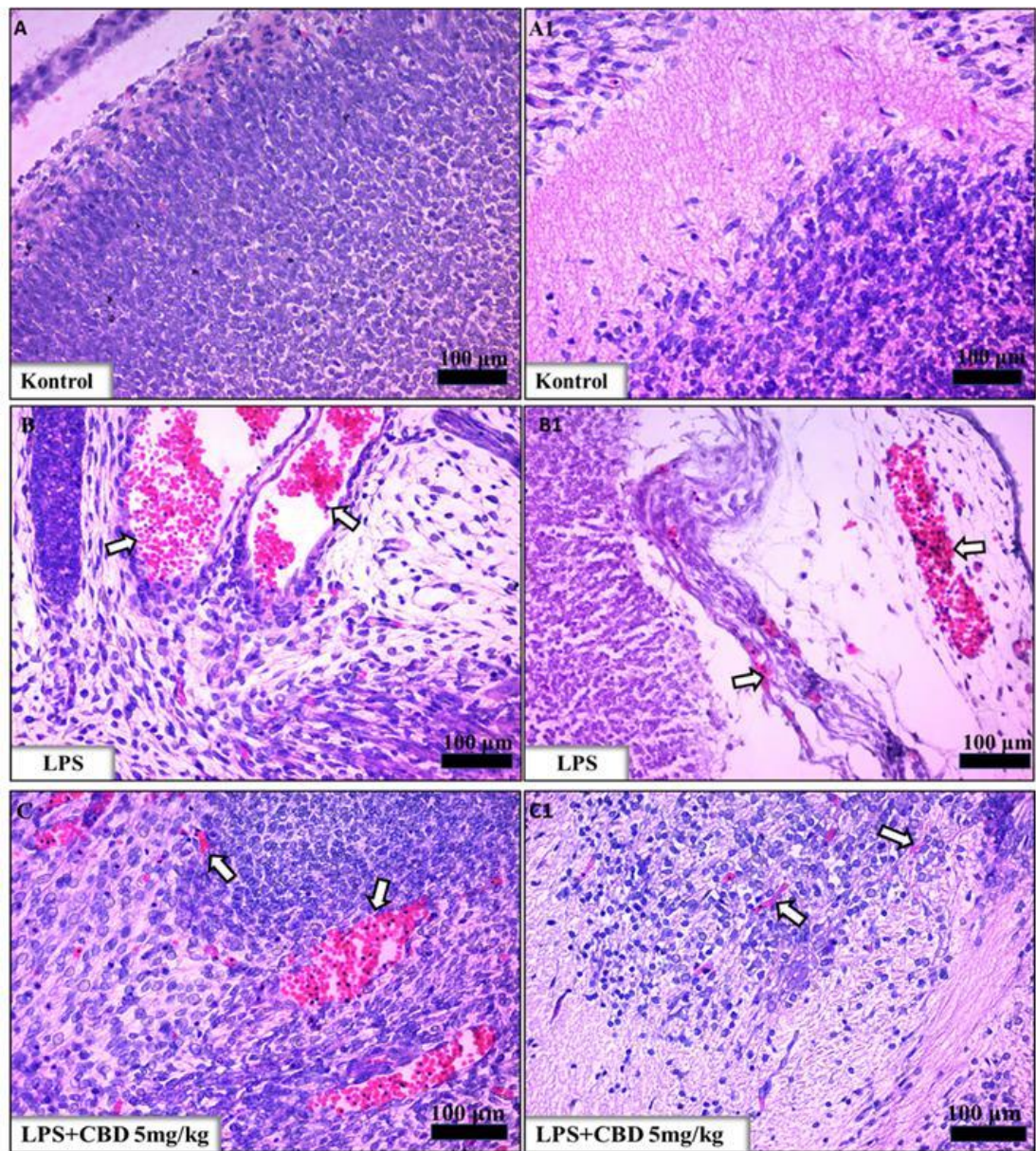
Tablo 4.8. Fetal beyin dokularında konjesyon&hemoraji, ödem ve meninkslerde kanama bulgularının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri. (-) skor (negatif skor), hiçbir yapısal değişikliğin olmamasını ifade etmektedir; (+) skor (bir pozitif skor), hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (++) skor (iki pozitif skor), orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (+++) skor (üç pozitif skor), ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

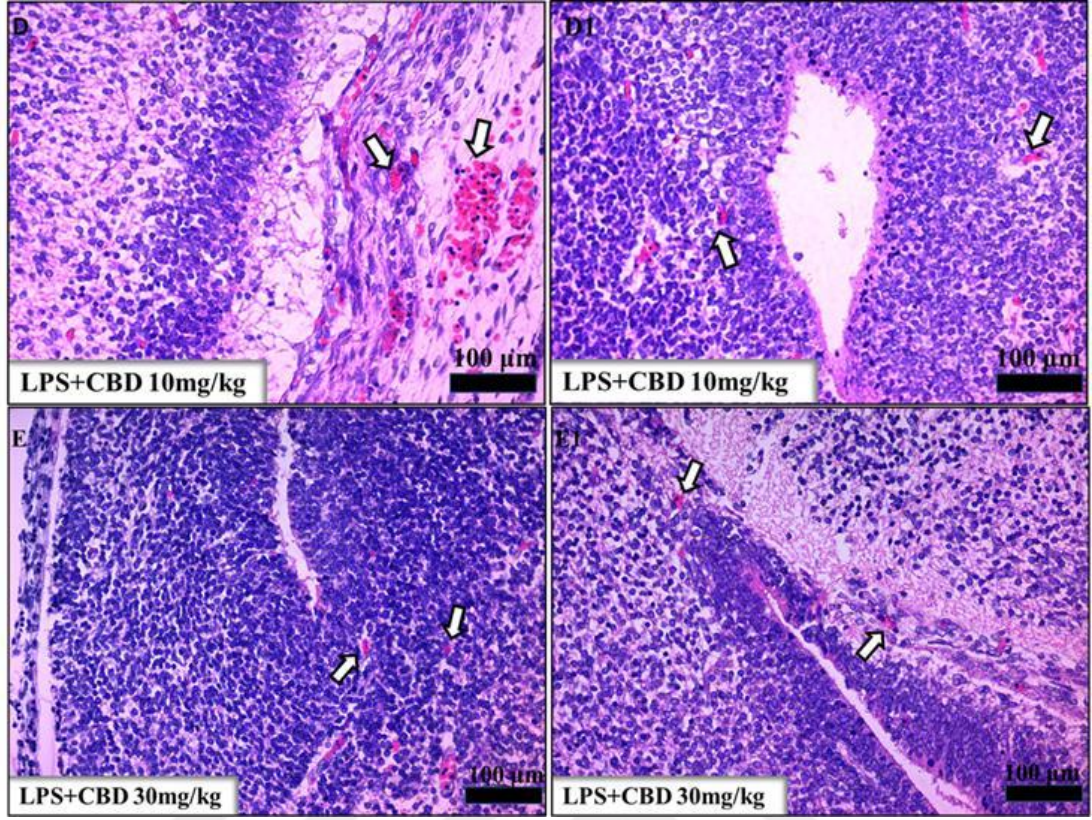
GRUPLAR	BULGULAR		
	Konjesyon ve Hemoraji	Ödem	Meninkslerde kanama
Kontrol (1)	++	+	++
Kontrol (2)	-	-	-
Kontrol (3)	-	-	-
Kontrol (4)	-	-	-
Kontrol (5)	-	-	-
Kontrol (6)	-	-	-
Kontrol (7)	-	-	-
Kontrol (8)	-	-	-
LPS (1)	++	+	++
LPS (2)	+	+	+
LPS (3)	++	++	++
LPS (4)	+++	++	+++
LPS (5)	++	+	++
LPS (6)	+++	++	+++
LPS (7)	++	++	++

LPS (8)	+	++	+
LPS+CBD 5mg/kg (1)	+	+	+
LPS+CBD 5mg/kg (2)	-	++	-
LPS+CBD 5mg/kg (3)	++	++	++
LPS+CBD 5mg/kg (4)	++	++	++
LPS+CBD 5mg/kg (5)	++	+	++
LPS+CBD 5mg/kg (6)	+++	+	+++
LPS+CBD 5mg/kg (7)	+	+	+
LPS+CBD 5mg/kg (8)	+	+	+
LPS+CBD 10mg/kg (1)	+	+	+
LPS+CBD 10mg/kg (2)	+	++	+
LPS+CBD 10mg/kg (3)	+	-	+
LPS+CBD 10mg/kg (4)	++	+	++
LPS+CBD 10mg/kg (5)	+	+	+
LPS+CBD 10mg/kg (6)	-	++	-
LPS+CBD 10mg/kg (7)	+	-	+
LPS+CBD 10mg/kg (8)	++	++	++
LPS+CBD 30mg/kg (1)	-	-	-
LPS+CBD 30mg/kg (2)	++	++	++
LPS+CBD 30mg/kg (3)	+	+	+
LPS+CBD 30mg/kg (4)	-	-	-
LPS+CBD 30mg/kg (5)	-	-	-
LPS+CBD 30mg/kg (6)	++	++	++
LPS+CBD 30mg/kg (7)	+	+	+
LPS+CBD 30mg/kg (8)	+	+	+

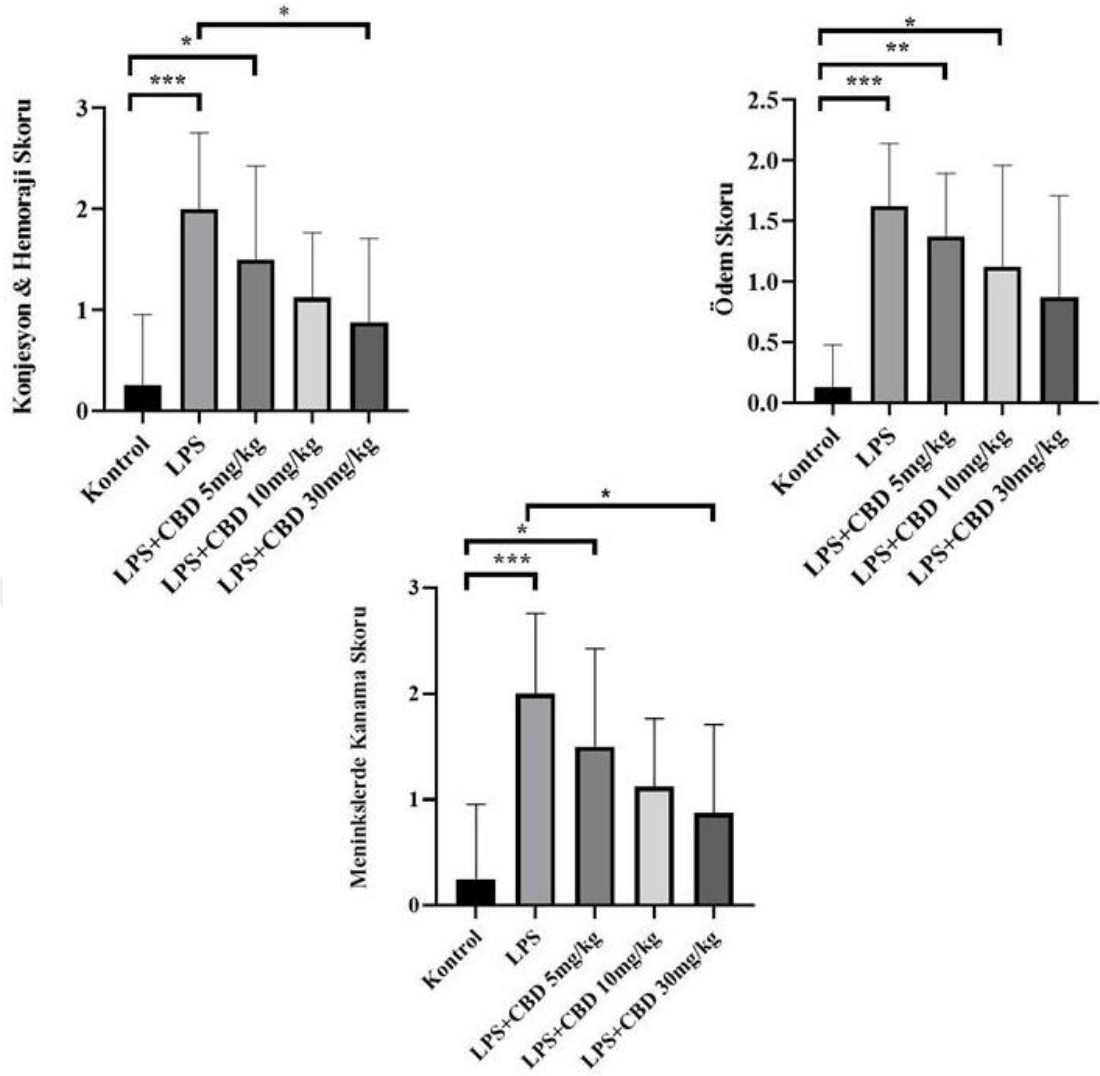
Tablo 4.9. Fetal beyin dokularında konjesyon&hemoraji, ödem ve meninkslerde kanama bulgularının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri. (-) skor (negatif skor), hiçbir yapısal değişikliğin olmamasını ifade etmektedir; (+) skor (bir pozitif skor), hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (++) skor (iki pozitif skor), orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (+++) skor (üç pozitif skor), ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

	Kontrol				LPS				LPS+CBD 5mg/kg				LPS+CBD 10mg/kg				LPS+CBD 30mg/kg			
Parametreler	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Konjesyon ve hemoraji	7	0	1	0	0	2	4	2	1	3	3	1	1	5	2	0	3	3	2	0
Ödem	7	1	0	0	0	3	5	0	0	5	3	0	2	3	3	0	3	3	2	0
Meninkslerde kanama	7	1	0	0	0	2	4	2	1	3	3	1	0	5	2	0	3	3	2	0





Resim 4.1. Fetal beyin dokularındaki histopatolojik bulgular. Kontrol grubuna ait görüntüde herhangi bir histopatolojik bulgu yoktur. LPS grubuna ait görüntülerde ise damarlarda konjesyon ve hemoraji ile mononükleer hücre infiltrasyonları (beyaz ok) görüldü. LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 10mg/kg gruplarına ait görüntülerde ise damarlarda konjesyon ve hemoraji (beyaz ok) gösterildi. (A, A1, B, B1, C, C1, D, D1, E, E1 sırasıyla kontrol, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarının 10x objektif büyütmesindeki görüntülerini belirtmektedir). Barlar =50 µm.



Şekil 4.9. Fetal beyin dokularında hematoksilin-eozin boyamalarına ait skorların grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=8$)

4.4.2. Plasenta Dokularında Hematoksilin-Eozin Boyama Bulguları

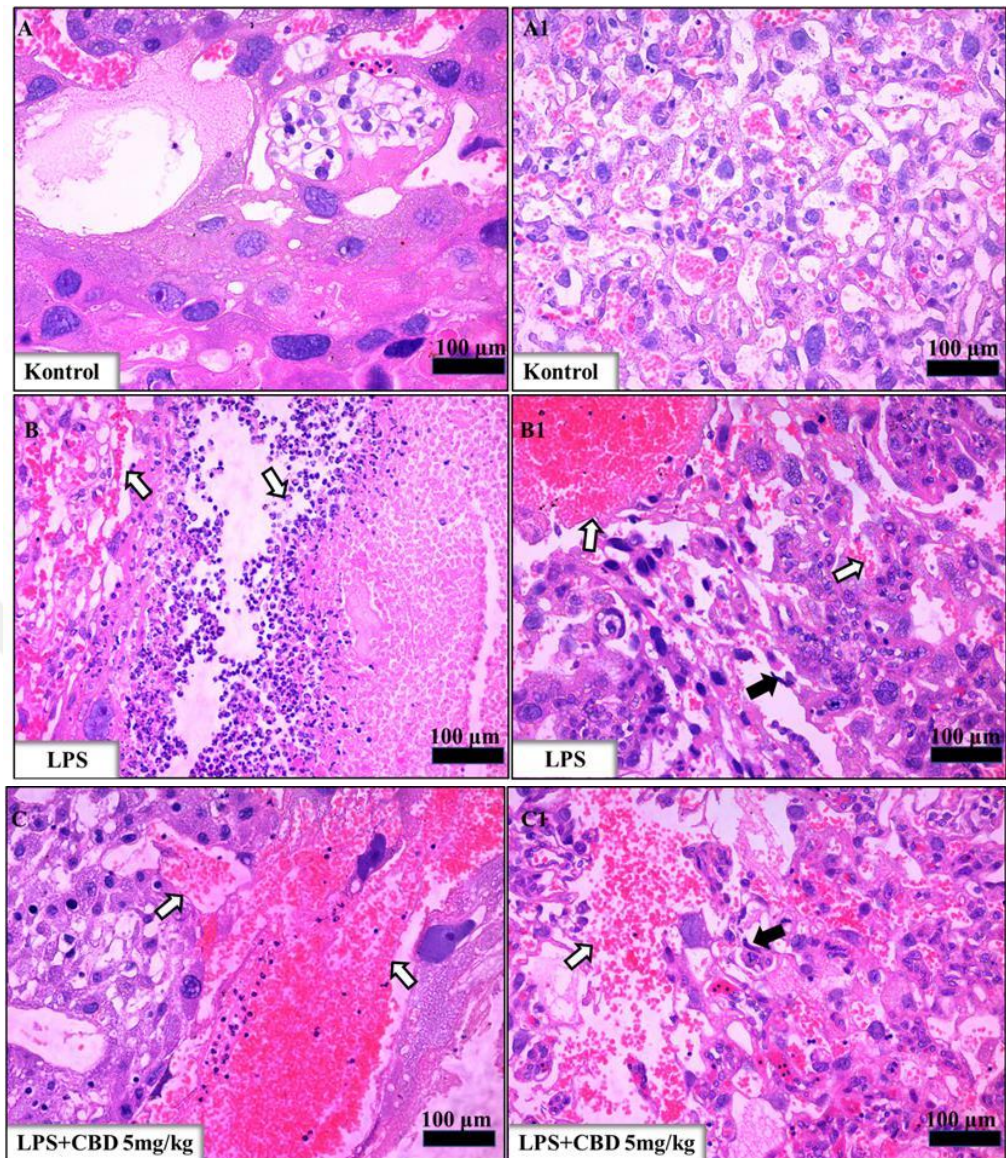
Plasenta dokularında HE boyama bulgularına ait skora Tablo 4.10.'da belirtilmiştir. Skora neticesinde kontrol grubundaki gebe ratların plasenta dokularına ait bazal ve labirent zon bulgularında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı. LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla bazal zonda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yoğun konjesyon-hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularında artış gözlemlendi ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına ait plasenta dokularında da konjesyon-hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularında LPS grubuyla benzer şekilde kontrol

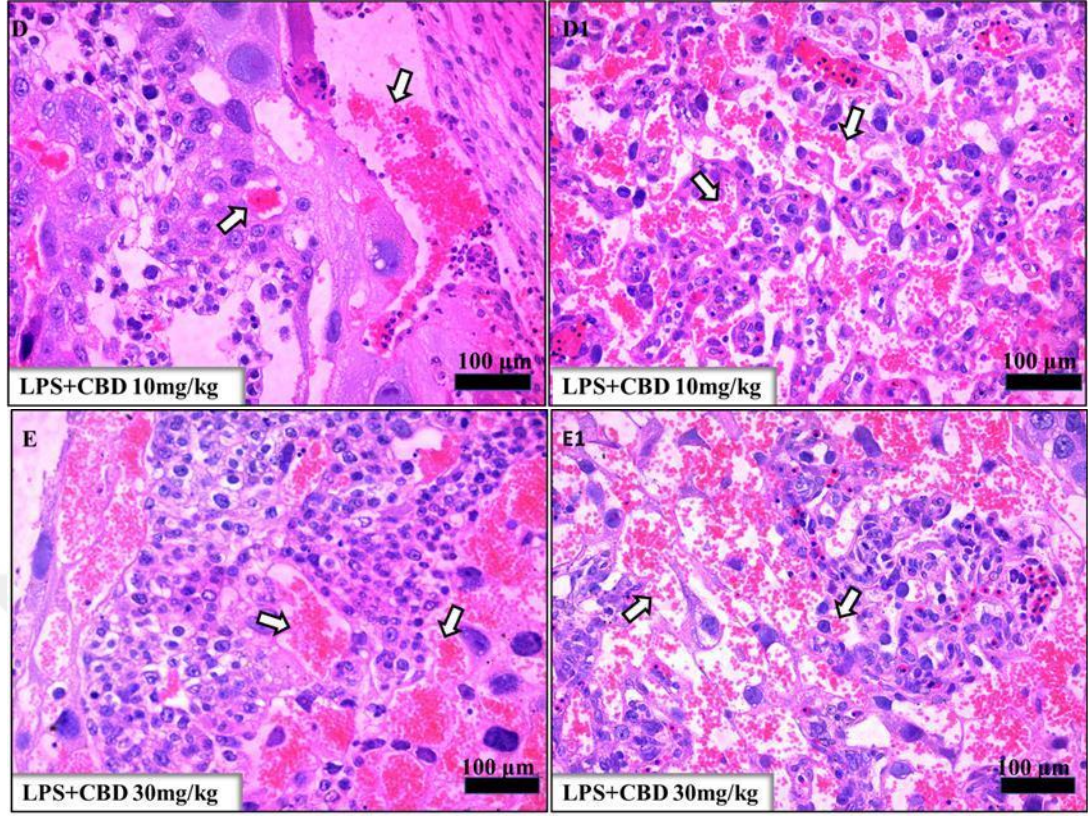
grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0.001$) (Resim 4.2, Şekil 4.10.).

Labirent zondaki trofoblastik hücre dejenerasyonu bulgularında LPS grubuna ait plasenta dokularında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulundu ($p<0.001$) (Resim 4.2., Şekil 4.11.). LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 10mg/kg gruplarında da LPS grubuyla benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde trofoblastik hücre dejenerasyonunun arttığı belirlendi ($p<0.001$, $p<0.001$). LPS+CBD 30mg/kg grubunda ise trofoblastik hücre dejenerasyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artmasına ($p<0.05$) karşın LPS grubuna ait bulgulara kıyasla trofoblastik hücre dejenerasyonun da azalma meydana geldi ($p<0.05$). Bununla birlikte LPS+CBD 30mg/kg grubunda LPS+CBD 5mg/kg grubuna göre trofoblastik hücre dejenerasyonu bulgularında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlemlendi ($p<0.01$). LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla, trofoblastik hücre dejenerasyonu bulgularıyla benzer şekilde mononükleer hücre infiltrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış gözlemlendi ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında da LPS grubuyla benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla mononükleer hücre infiltrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış meydana geldiği görüldü ($p<0.001$)(Resim 4.2., Şekil 4.11.).

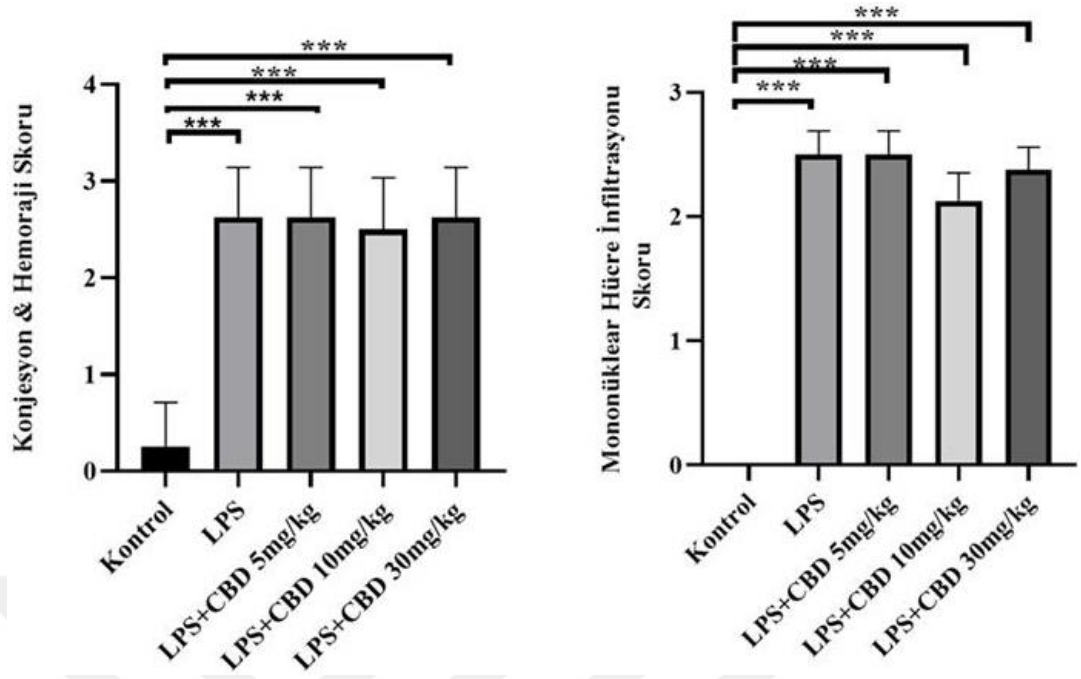
Tablo 4.10. Plasenta dokularında bazal zon ve labirent zona ait histopatolojik bulguların gruplara göre skorlanması.

GRUPLAR	BAZAL ZON BULGULARI		LABİRENT ZON BULGULARI	
	Konjesyon& Hemoraji	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	Trofoblastik Hücre Dejenerasyonu	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu
Kontrol (1)	+	-	-	-
Kontrol (2)	-	-	-	-
Kontrol (3)	-	-	-	-
Kontrol (4)	-	-	-	-
Kontrol (5)	-	-	-	-
Kontrol (6)	-	-	-	-
Kontrol (7)	+	-	-	-
Kontrol (8)	-	-	-	-
LPS (1)	+++	+++	+	++
LPS (2)	+++	++	++	++
LPS (3)	+++	+++	+++	+++
LPS (4)	++	++	++	++
LPS (5)	+++	++	++	++
LPS (6)	++	++	+	++
LPS (7)	++	+++	+++	+++
LPS (8)	+++	+++	++	+++
LPS+CBD 5mg/kg (1)	+++	+++	+++	+++
LPS+CBD 5mg/kg (2)	++	++	+	+++
LPS+CBD 5mg/kg (3)	+++	+++	+++	+++
LPS+CBD 5mg/kg (4)	+++	+++	++	++
LPS+CBD 5mg/kg (5)	+++	++	++	++
LPS+CBD 5mg/kg (6)	+++	+++	++	++
LPS+CBD 5mg/kg (7)	++	++	+++	++
LPS+CBD 5mg/kg (8)	++	++	++	+++
LPS+CBD 10mg/kg (1)	+++	+++	+	+++
LPS+CBD 10mg/kg (2)	+++	+++	+++	++
LPS+CBD 10mg/kg (3)	+++	++	+	++
LPS+CBD 10mg/kg (4)	++	+	+	+
LPS+CBD 10mg/kg (5)	++	++	++	++
LPS+CBD 10mg/kg (6)	++	++	+	++
LPS+CBD 10mg/kg (7)	++	++	++	++
LPS+CBD 10mg/kg (8)	+++	++	+	++
LPS+CBD 30mg/kg (1)	++	++	+	++
LPS+CBD 30mg/kg (2)	+++	+++	-	+
LPS+CBD 30mg/kg (3)	+++	++	+	++
LPS+CBD 30mg/kg (4)	++	+++	+	++
LPS+CBD 30mg/kg (5)	+++	++	+	+++
LPS+CBD 30mg/kg (6)	+++	++	++	+++
LPS+CBD 30mg/kg (7)	+++	+++	+	++
LPS+CBD 30mg/kg (8)	++	++	+	++

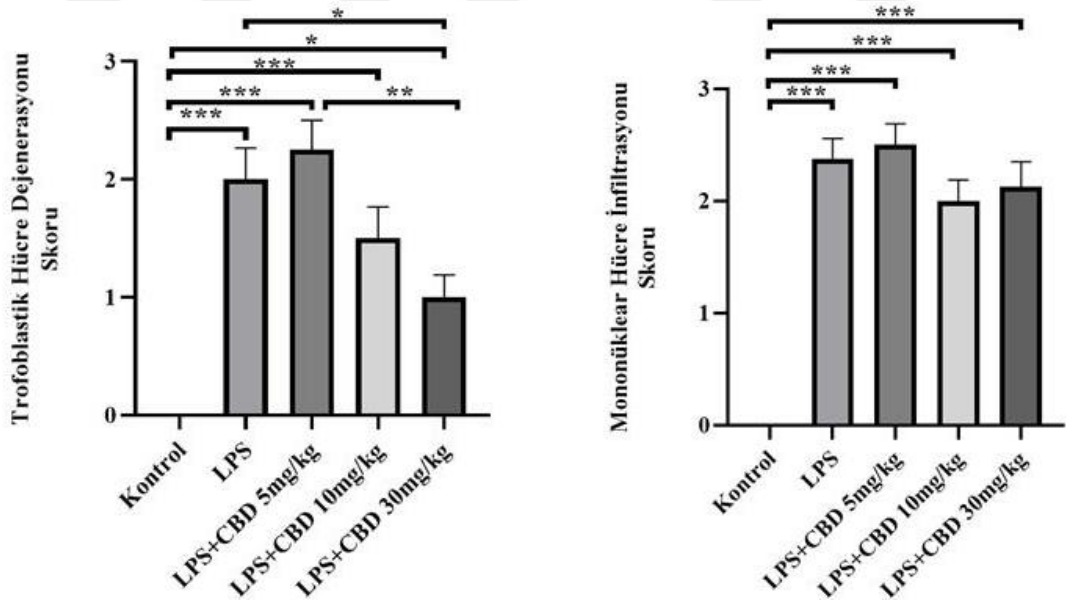




Resim 4.2. Placenta dokularının histopatolojik değerlendirmesi. Kontrol grubuna ait görüntüde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı. LPS grubuna ait görüntülerde ise damarlarda konjesyon, hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) ile trofoblastik hücrelerde dejenerasyonu (siyah ok) görüldü. LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarına ait görüntülerde ise damarlarda konjesyon, hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) gösterilmiştir (A, A1, B, B1, C, C1, D, D1, E, E sırasıyla kontrol, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarının 10x objektif büyütmesindeki görüntülerini belirtmektedir). Barlar =50 µm.



Şekil 4.10. Plasenta dokularında hematoksilin-eozin boyamalarına ait bazal zon bulguları skorlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=8$)



Şekil 4.11. Plasenta dokularında hematoksilin-eozin boyamalarına ait labirent zon bulguları skorlarının istatistiksel olarak değerlendirmesi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=8$)

4.4.3. Fetal Beyin Dokularında TNF- α İmmün Boyama Bulguları

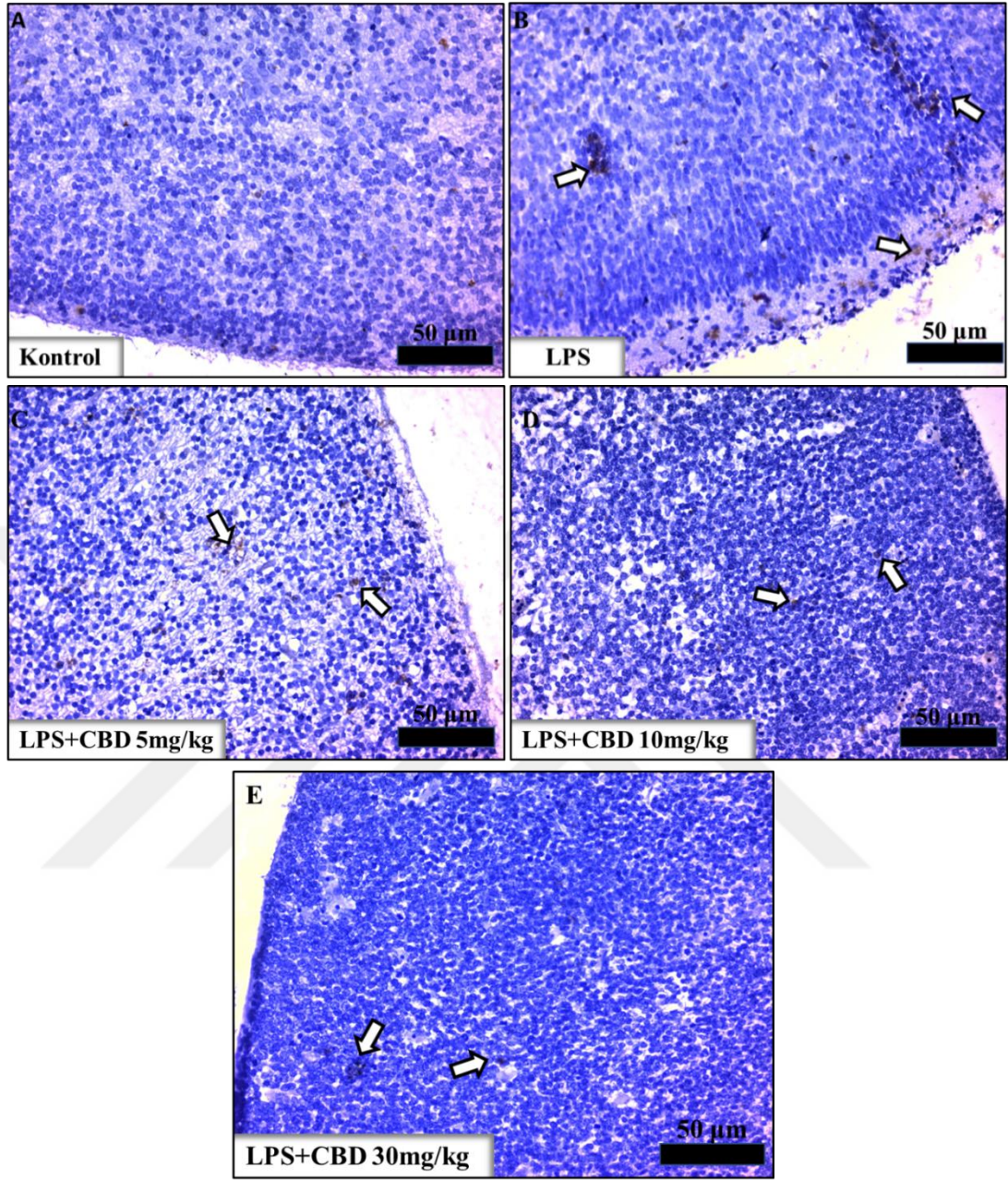
Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama bulgularına ait skorlama Tablo 4.12.'de belirtilmiştir. Kontrol grubuna ait ratların fetal beyin dokularında az miktarda TNF- α immün boyaması incelendi (Resim 4.3.). LPS grubuna ait fetal beyin dokularında, TNF- α düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p<0.001$) (Resim 4.3., Şekil 4.12.). LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg CBD uygulanan gruplarda gözlemlenen TNF- α düzeylerinin LPS grubuna kıyasla daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 10mg/kg gruplarında TNF- α düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlemlenirken ($p<0.01$, $p<0.05$), LPS+CBD 30mg/kg grubunda kontrol grubuyla benzer şekilde az miktarda TNF- α immün boyaması tespit edildi (Resim 4.3., Şekil 4.12.). Bütün gruplar için antikor validasyonu yapıldı.

Tablo 4.12. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama bulgularının gruplara göre skorlanması.

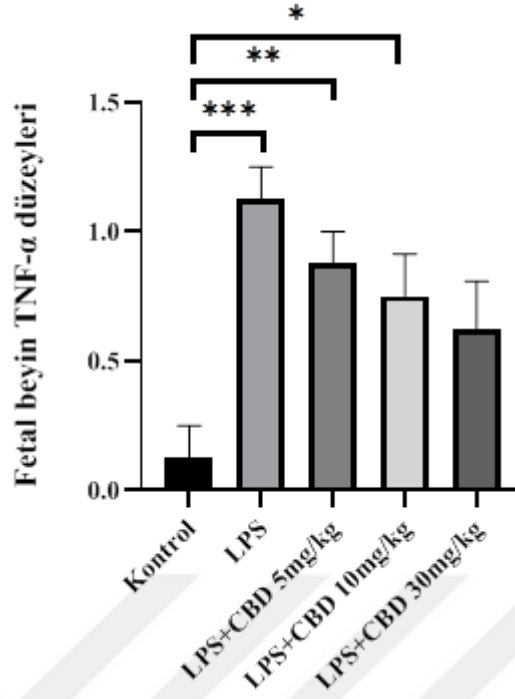
GRUPLAR	BULGULAR
	TNF- α
Kontrol (1)	-
Kontrol (2)	+
Kontrol (3)	-
Kontrol (4)	-
Kontrol (5)	-
Kontrol (6)	-
Kontrol (7)	-
Kontrol (8)	-
LPS (1)	+
LPS (2)	++
LPS (3)	+
LPS (4)	+
LPS (5)	+
LPS (6)	+
LPS (7)	+
LPS (8)	+
LPS+CBD 5mg/kg (1)	+
LPS+CBD 5mg/kg (2)	+
LPS +CBD 5mg/kg (3)	-
LPS+CBD 5mg/kg (4)	+
LPS+CBD 5mg/kg (5)	+
LPS+CBD 5mg/kg (6)	+
LPS+CBD 5mg/kg (7)	+
LPS+CBD 5mg/kg (8)	+
LPS+CBD 10mg/kg (1)	-
LPS+CBD 10mg/kg (2)	+
LPS+CBD 10mg/kg (3)	+
LPS+CBD 10mg/kg (4)	+
LPS+CBD 10mg/kg (5)	-
LPS+CBD 10mg/kg (6)	+
LPS+CBD 10mg/kg (7)	+
LPS+CBD 10mg/kg (8)	+
LPS+CBD 30mg/kg (1)	+
LPS+CBD 30mg/kg (2)	+
LPS+CBD 30mg/kg (3)	+
LPS+CBD 30mg/kg (4)	-
LPS+CBD 30mg/kg (5)	-
LPS+CBD 30mg/kg (6)	+
LPS+CBD 30mg/kg (7)	-
LPS+CBD 30mg/kg (8)	+

Tablo 4.13. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama skorlarının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri. (-) skor (negatif skor), hiçbir yapısal değişikliğin olmamasını ifade etmektedir; (+) skor (bir pozitif skor), hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (++) skor (iki pozitif skor), orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (+++) skor (üç pozitif skor), ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

FETAL BEYİN	Kontrol				LPS				LPS+CBD5 mg/kg				LPS+CBD 10mg/kg				LPS+CBD 30mg/kg			
Parametre	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
TNF- α	7	1	0	0	0	7	1	0	1	7	0	0	0	6	0	0	3	5	0	0



Resim 4.3. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyamalarına ait görüntüler. Kontrol grubuna ait görüntülerde herhangi bir TNF- α boyamasına rastlanmadı. LPS, LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 10mg/kg gruplarında ise az olmakla birlikte TNF- α boyamaları (beyaz ok) gözlemlendi. LPS+CBD 30mg/kg grubuna ait görüntülerde ise TNF- α boyaması tespit edilmedi. (A, B, C, D, E sırasıyla kontrol, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarının 20x objektif büyütmesindeki görüntülerini belirtmektedir). Barlar =50 μ m.



Şekil 4.12. Fetal beyin dokularında TNF- α immün boyamalarına ait grup skorlarının grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=8$)

4.4.4. Plasenta Dokularında TNF- α İmmün Boyama Bulguları

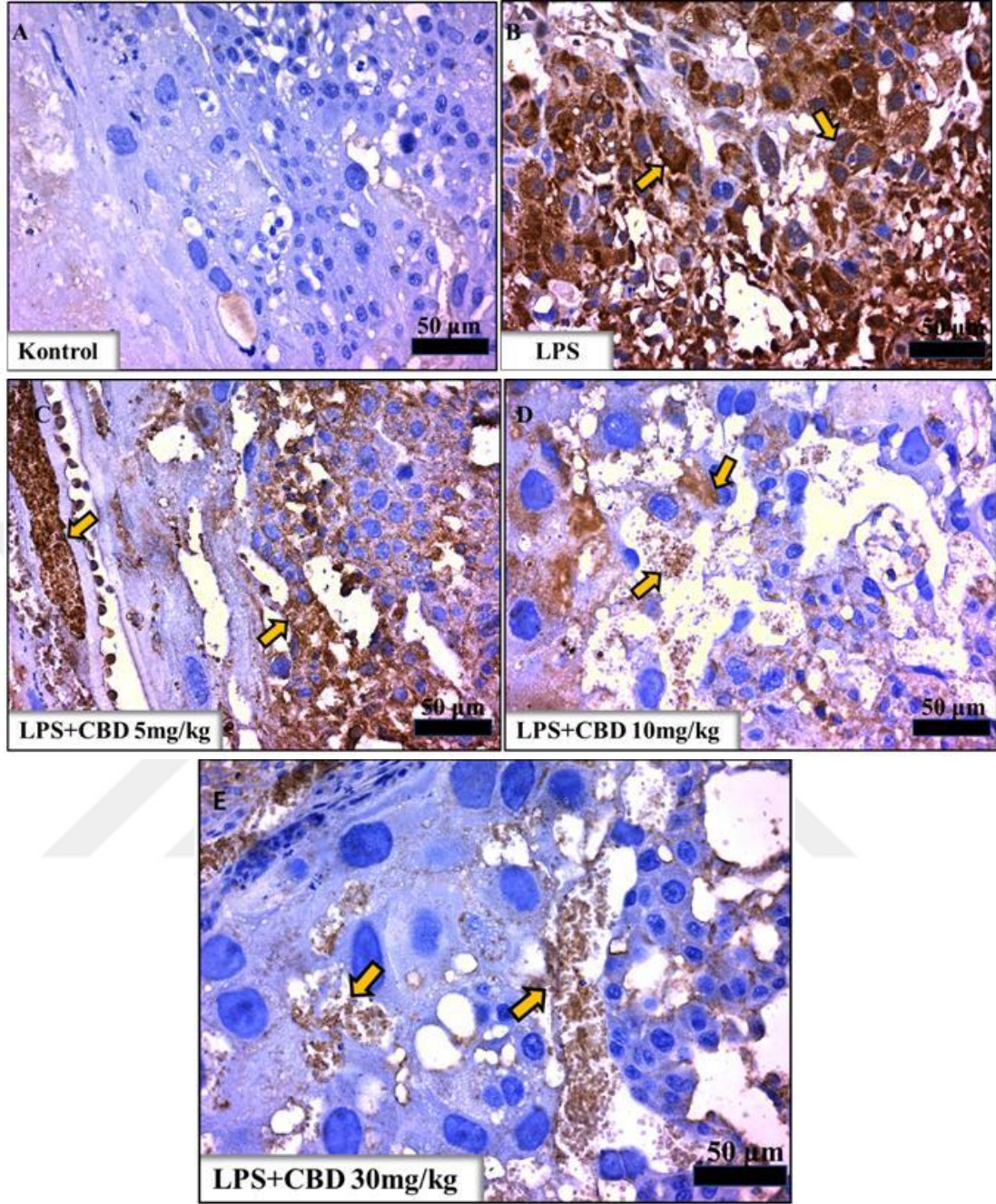
Plasenta dokularında TNF- α immün boyama bulgularına ait skorlama Tablo 4.14.'de belirtilmiştir. Kontrol grubuna ait ratların plasenta dokularında az miktarda TNF- α immün boyaması saptandı (Resim 4.4.). LPS grubuna ait plasenta dokularında, TNF- α düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında LPS grubuna kıyasla TNF- α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlemlenirken ($p<0.05$, $p<0.01$), LPS+CBD 10mg/kg grubunda LPS grubuna kıyasla TNF- α düzeylerinde görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Bütün gruplar için antikor validasyonu yapıldı (Resim 4.4., Şekil 4.13.).

Tablo 4.14. Plasenta dokularında TNF- α immün boyama bulgularının gruplara göre skorlanması.

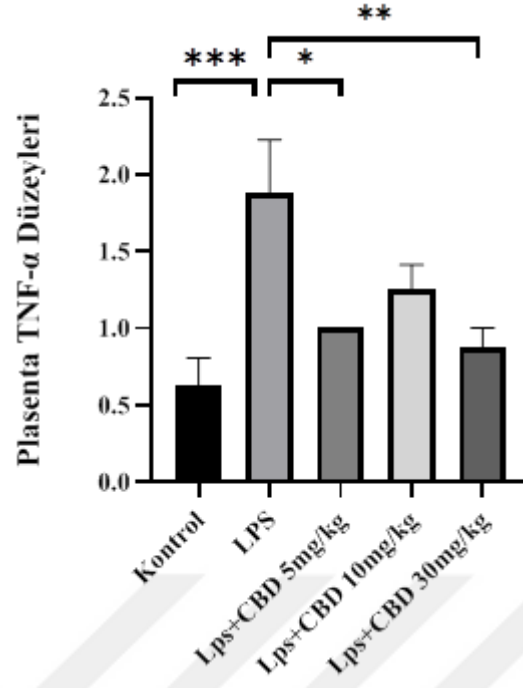
GRUPLAR	BULGULAR
	TNF- α
Kontrol (1)	+
Kontrol (2)	+
Kontrol (3)	-
Kontrol (4)	+
Kontrol (5)	-
Kontrol (6)	+
Kontrol (7)	+
Kontrol (8)	-
LPS (1)	++
LPS (2)	+
LPS (3)	+++
LPS (4)	+
LPS (5)	+
LPS (6)	+++
LPS (7)	+++
LPS (8)	+
LPS+CBD 5mg/kg (1)	+
LPS+CBD 5mg/kg (2)	+
LPS+CBD 5mg/kg (3)	+
LPS+CBD 5mg/kg (4)	+
LPS+CBD 5mg/kg (5)	+
LPS+CBD 5mg/kg (6)	+
LPS+CBD 5mg/kg (7)	+
LPS+CBD 5mg/kg (8)	+
LPS+CBD 10mg/kg (1)	++
LPS+CBD 10mg/kg (2)	+
LPS+CBD 10mg/kg (3)	++
LPS+CBD 10mg/kg (4)	+
LPS+CBD 10mg/kg (5)	+
LPS+CBD 10mg/kg (6)	+
LPS+CBD 10mg/kg (7)	+
LPS+CBD 10mg/kg (8)	+
LPS+CBD 30mg/kg (1)	+
LPS+CBD 30mg/kg (2)	+
LPS+CBD 30mg/kg (3)	+
LPS+CBD 30mg/kg (4)	+
LPS+CBD 30 mg/kg (5)	+
LPS+CBD 30mg/kg (6)	-
LPS+CBD 30mg/kg (7)	+
LPS+CBD 30mg/kg (8)	-

Tablo 4.15. Plasenta dokularında TNF- α immün boyama skorlarının gruplara göre dağılımının sayısal değerleri. (-) skor (negatif skor), hiçbir yapısal değişikliğin olmamasını ifade etmektedir; (+) skor (bir pozitif skor), hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (++) skor (iki pozitif skor), orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir; (+++) skor (üç pozitif skor), ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

PLASENTA	Kontrol	LPS	LPS+CBD 5mg/kg	LPS+CBD 10mg/kg	LPS+CBD 30mg/kg
Parametre	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
TNF- α	0 5 0 0	0 4 1 3	0 8 0 0	0 6 2 0	2 6 0 0



Resim 4.4. Plasenta dokularında TNF- α boyamalarına ait görüntüler. Kontrol grubuna ait görüntülerde herhangi bir TNF- α boyamasına rastlanmadı. LPS grubuna ait görüntülerde ise yoğun TNF- α boyanma bölgeleri (sarı ok) gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise TNF- α boyanma şiddetinde azalmalar olduğu tespit edildi. (A, B, C, D, E sırasıyla kontrol, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarının 20x objektif büyütmesindeki görüntülerini belirtmektedir). Barlar =50 μ m.



Şekil 4.13. Plasenta dokularında TNF- α immün boyamalarına ait grup skorlarının grafiksel gösterimi. One-way ANOVA ve Tukey's multiple comparison testi yapıldı. '*' $p<0.05$, '**' $p<0.01$, '***' $p<0.001$. ($n=8$)

5. TARTIŞMA

Her yıl 15 milyon gebeliği etkileyen ve yenidoğanlarda ölüme yol açabilen PE, aynı zamanda hayatta kalan bebeklerin yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde nörogelişimsel, kardiyometabolik ve inflamatuvar bozuklukluların oluşumu için önemli bir risk faktörüdür (1,3,5). PE'nin patogeneze ilişkin mevcut bilgilerin yetersizliği, hedefe yönelik ve etkili tedavi seçeneklerinin sınırlı olmasına yol açmaktadır. İkiz gebelikler, koryoamniyonit, annede önceden varolan hastalıklar, genetik faktörler ve uterus anomalileri PE'nin bilinen risk faktörleridir, ancak büyük bir kısmının tanımlanabilir bir nedeni bulunmamaktadır (2,25,194).

İnflamasyon, doğum sürecinin önemli fizyolojik bir tetikleyicisidir, hem term hem de preterm doğumu başlatan ortak bir paydadır (7). Gebelik sürecinde inflamasyonun başlamasına yol açan fetomaternal immün toleransın bozulması bir dizi gebelik komplikasyonuna yol açabilmektedir (195,196). Bununla birlikte, gebelik sırasında gelişen enfeksiyonların çocuklarda otizm spektrum bozukluğu ve şizofreni gibi nörogelişimsel bozuklukların görülme olasılığını artırdığı bilinmektedir (197,198). LPS, Poly I:C gibi gerçek patojenlerden yoksun bakteriyel veya viral mimetiklerin gebelik sırasında immün aktivasyona yol açarak çeşitli memeli modellerinde yapılan çalışmalarda yavrularda nörogelişimsel bozuklukları indüklediği gösterilmiştir (199)

Kenevir bitkisi, tıbbi etkileri nedeniyle uzun zamandır birçok araştırmanın odağı olmuştur. Kenevirden elde edilen kannabinoidler fitokannabinoidler olarak adlandırılmaktadır ve bunlardan en çok üzerinde çalışılan iki bileşen THC ve CBD'dir (200). THC, CBD'nin aksine ciddi derecede öforik özelliğe sahiptir ve kenevirdeki birincil psikoaktif bileşiktir. Reseptör bağlanma afinitelerindeki farklılıklara bağlı olarak, CBD'nin THC'ye kıyasla daha az psikoaktif semptomlara sebep olması ve kötüye kullanım potansiyeline sahip olması, CBD üzerinde daha fazla araştırma yapılmasına neden olmuştur. CBD'nin güvenlik derecesini tamamlamak için yapılan çok sayıda pre-klinik ve klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda CBD kullanımının insanlarda güvenli olduğunu kanıtlanmıştır (201). FDA, ABD ve Avrupa ülkelerinde giderek kullanımı yaygınlaşmakta olan CBD yağı içeren ürünleri özel olarak düzenlemektedir ve kuru

ağırlık olarak %0.3'ten fazla THC içermemeleri gerektiğini şart koşmuştur. THC konsantrasyonu ve kimyasal ekstraksiyonun bitki kaynağı gibi faktörler CBD içeren ürünlerin yasal düzenlemelerini etkilemektedir (202,203).

Yapılan çalışmalar CBD'nin (Epidiolex®) Dravet ve Lennox-Gastaut sendromları ve son zamanlarda tüberoskleroz kompleksine ikincil nöbetler, şiddetli, inatçı nöbetlerle ilişkili tüm çocukluk çağı epilepsi formları için etkili bir alternatif tedavi olduğunu ortaya koymuştur. Dravet Sendromlu 2-18 yaş arası 120 hastada yapılan randomize, çift kör bir çalışmada, 14 hafta boyunca 20 mg/kg/gün oral CBD kullanımının aylık ortalama motor nöbetleri plasebo ile %13,3'e kıyasla %38,9 oranında azalttığı bulunmuştur (204). Bir başka çalışmada, tedaviye dirençli Lennox-Gastaut hastalarına (2-55 yaş arası) 14 hafta boyunca 20 mg/kg/gün oral CBD veya plasebo verilmiştir, CBD alan hastalarda nöbetlerde %43,9 azalma görülürken, plasebo alan hastalarda bu oran %21,8 olmuştur (205). Bu çalışmalar, Dravet ve Lennox-Gastaut sendromları için CBD'nin etkinlik ve güvenliğine ilişkin destekleyici kanıtlar sunarak 2018 yılında FDA tarafından onaylanmasını sağlamıştır. Temmuz 2020'de FDA, Epidiolex® onayını tüberoskleroz kompleksine bağlı nöbetlerin tedavisini de içerecek şekilde genişletmiştir (206). Farklı *in vivo* çalışmalar epilepsinin yanı sıra CBD'nin MS, şizofreni, nöropatik ağrı ve Alzheimer hastalığı gibi farklı hastalık modellerinde yararlı etkilerini göstermiştir. CBD'nin anti-anksiyolitik ve antidepresan özellikleri de dahil olmak üzere faydalı etkileri çeşitli klinik çalışmalarla gösterilmiştir (207). Bununla birlikte CBD ağrı, uykusuzluk, depresyon, baş ağrısı ve mide bulantısı gibi durumlarda tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar CBD uygulaması ile pankreas, glioma, melanom, meme, kolorektal karsinom ve prostat gibi çeşitli kanser türlerinin proliferasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (208-210).

Kenevir, ABD'de gebelik sırasında en sık kullanılan uyuşturucu maddeler arasında yer almaktadır ve hem tıbbi kullanımı hem de yetişkin kullanımı giderek artmaktadır (211-213). Tıbbi kannabinoidlerin sıklıkla ağrı, spastisite, epilepsi, MS, kemoterapötiklere bağlı bulantı-kusma, kanser, glokom, post travmatik stres bozukluğu ve dejeneratif nörolojik bozukluklar gibi çeşitli durumlarda kullanıldığı bilinmektedir (214,215). Anne ve fetus için zararlı etkileri olduğu düşünülse de son araştırmalar kenevire ait bazı türevlerin birçok klinik fayda sağladığını ve çok az yan

etki potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (216). Bunlardan psikoaktif ve bağımlılık yapıcı etkisi olmadığı kanıtlanan CBD ($C_{21}H_{30}O_2$, ethyl-6prop-1-en-2-ylcyclohex2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol), gebelik sırasında antiemetik ve anksiyolitik etkileri sebebiyle kullanılmaktadır. Avrupa ve ABD başta olmak üzere CBD içeren ürünlerin pazar büyüklüğü pek çok ülkede giderek artmaktadır. Gebelik döneminde bu ürünleri kullanan kadınların sayısının %2 ile %5 arasında değişmekte olup, bu sayının gün geçtikçe arttığı tahmin edilmektedir ve CBD'nin fetal güvenliğini destekleyen bilimsel kanıtların yetersizliği nedeniyle, fetüs üzerindeki etkileri konusunda endişeler devam etmektedir (217,218). Ayrıca CBD de dahil olmak üzere kannabinoidlerin plasental bariyeri kolayca geçebildiği bilinmektedir (219). Gebe ratlarda yapılan bir çalışma, annelere uygulanan CBD'nin fetüslerde oluşan inflamasyonu azaltarak gastroşiziste tedavi seçeneği olarak tercih edilebileceğini öne sürmüştür (220). Tez çalışmalarımız kapsamında CBD'nin gebelikte LPS ile indüklenen sistemik inflamasyon modelinde fetal nöroinflamasyon ve nörogenez üzerindeki etkisini araştırmayı hedeflediğimiz çalışmalar gerçekleştirildi. Yaptığımız bu çalışmada LC-MS/MS ölçümlerinde fetal beyin ve plasenta dokularında kontrol ve LPS gruplarında CBD saptanmazken, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında CBD birikimi uygulama dozlarıyla paralel şekilde artış gösterdi. Bu sonuçlarımız literatürle paralel şekilde CBD'nin plasental bariyeri geçtiğini ve fetal beyine ulaştığını bir kez daha doğruladı (217) (Şekil 4.2., Şekil 4.3.)

SSS ve periferik sinir sistemini etkileyen elektriksel, biyokimyasal ve yapısal anormallikler olarak karakterize edilen nörolojik bozukluklar, kısmi veya tam felç, kas güçsüzlüğü, duyu kaybı, nöbetler ve bilişsel disfonksiyonlar gibi çeşitli semptomlara yol açabilir (221). Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde nüfusun %25'inin yaşamının bir aşamasında Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, epilepsi, MS, nöropatik ağrı ve Parkinson hastalığı gibi bir veya birden fazla nörolojik bozukluk geliştireceği tahmin edilmektedir (222). Çalışmalar sonucunda elde edilen kanıtlar, nöroinflamasyonun yaygın nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

Artan kanıtlar, nöroinflamasyonun yaygın nörolojik bozuklukların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Nöroinflamasyon,

mikroglial ve astrositler gibi diğer SSS hücreleri arasında koordineli bir yanıtı içerir ve bu hücreler diğer hücrelerden gelen inflamatuvar sinyalleri alır ve güçlendirir. Mikroglia, beyin gelişiminde ve doku homeostazının korunmasında önemli bir rol oynayan MSS'nin yerleşik bağışıklık hücreleridir (223,224). Patolojik koşullar altında, stres, kronik inflamasyon veya patojenler gibi risk faktörlerine yanıt olarak mikrogliaların aşırı aktivasyonu, komşu nöronal dokularda bozulmuş nöronal sağkalıma veya indüklenmiş nöronal toksisiteye yol açar (224). Mikroglia aracılı nöroinflamasyonun neden olduğu nöronal mikroçevredeki bu yıkıcı etkiler MS, Alzheimer hastalığı, hipoksik iskemik ensefalopati, şizofreni ve nöropatik ağrı gibi birçok nörolojik bozuklukta gözlemlenmiştir (225-227). Bu nedenle, nörolojik bozukluklar için birincil terapötik hedef olarak mikroglia hücresi tarafından yayılan nöroinflamasyonu anlamaya yönelik araştırmalar devam etmektedir (228).

CBD'nin nöroproteksiyon üzerindeki terapötik potansiyeli, MS, şizofreni, epilepsi ve otoimmün ensefalomyelit (EAE), iskemik olaylar sırasında serebral dolaşım ve sepsisle ilişkili ensefalit dahil olmak üzere akut ve kronik nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için çok sayıda klinik çalışmada araştırılmıştır. Bu nöroprotektif etkiler CBD'nin bağışıklık hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık yanıtı dizinleme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. CBD'nin mikroglial hücrelerde LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde ROS/NF- κ B sinyal mekanizmasını inhibisyonu aracılığıyla proinflamatuvar sitokin düzeylerini azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği ortaya konulmuştur (229). Bir başka çalışmada, CBD'nin CB1/CBD2 sinyalizasyonu üzerinden alerjik astım modelinde akciğer inflamasyonunu ve yeniden düzenlenmesini geriletmediği ortaya konulmuştur (230). Biz de bu modellerdeki etkilerine benzer şekilde inflamasyon üzerindeki etkisini TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve p(Ser536)-NF- κ B parametrelerine bakarak inceledik. 5mg/kg, 10mg/kg ve 30 mg/kg CBD uygulamaları, TNF- α , IL-1 β düzeylerinde (sırasıyla, 1.13, 1.6, 3.29 kat), NF- κ B (sırasıyla 2.5, 4.06, 4.64 kat) ve p(Ser536)-NF- κ B (sırasıyla 3.08, 3.33, 2.86 kat) ifade düzeylerinde azalmaya yol açtı (Tablo 4.5.). Bu bağlamda CBD'nin gebelikte LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde fetal beyinde nöroinflamasyon üzerindeki anti-inflamatuvar etkisi doğrulandı (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.8., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).

İnflamasyon, yaralanma ve enfeksiyona karşı bir bağışıklık tepkisidir ve otoimmün hastalıklar, metabolik sendrom, nörodejeneratif hastalıklar, çeşitli kanser türleri ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik durum için kritik öneme sahiptir. Günümüzde inflamasyonun moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir, ancak inflamatuvar sinyalin süresinin ve inflamasyon sonucunda üretilen parametrelerin düzeylerinde gözlenen heterojenite ve bununla birlikte henüz tanımlanamış olan kompleks protein trafikleri nedeniyle mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Aynı zamanda inflamasyonu ortaya çıkaran faktörlerin (bakteriyel enfeksiyon, viral enfeksiyon, fiziksel doku hasarı gibi) farklı moleküler sinyalleri kullanarak oluşturduğu hücresel süreçler nedeniyle farklılıklar sergilemektedir. Bu sebeple uzun yıllardır inflamasyonun moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik süren çalışmalar devam etmektedir.

İnflamasyon başlıca iki türe sahiptir bunlar; düzensiz bir inflamasyon formu olarak tanımlanabilecek kronik inflamasyon ve düzenlenmiş bir form olarak tanımlanabilecek akut inflamasyondur. Birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rolü olan inflamasyonun altında yatan mekanizmaların aydınlatılması yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir (231). İnflamasyonun moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik sürdürülen *in vivo* ve *in vitro* deney modellerinde inflamatuvar uyarımlar için çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır.

LPS, bakır (II) sülfat (CuSO_4), lökotrien B4 (LTB4) ve enterokolit inflamasyon modellerinde kullanılan başlıca yaklaşımlardır (232). Bunlardan en sık kullanılan LPS aracılı gerçekleştirilen inflamasyon modelleridir. LPS, çoğu gram-negatif bakterinin dış membranının dış katmanında sıkı koruyucu kalkan gibi çalışan ana bileşendir. Lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O-spesifik oligosakkarit zinciri gibi benzersiz moleküllerden oluşur (10). LPS çeşitli *in vivo* ve *in vitro* şartlarda inflamasyonun deney modelini taklit etmek amacıyla inflamasyon aracılı sinyal mekanizmasının uyarımını indüklemektedir (11). Aynı zamanda merkezi sinir sistemine (MSS) veya periferik tek veya çoklu enjeksiyonlarla uygulanabilmektedir. Bu nedenle, etkileri deneysel protokole göre değişebilmektedir.

In vivo ve *in vitro* çalışmalarda uygulanan LPS konstrasyonu ve süresi yeterli ve doğru inflamasyonun uyarılması için değişebilmektedir. Bu nedenle bazı anahtar inflamatuvar parametrelerin LPS uygulamasını takiben düzeylerindeki değişimlerin incelenmesi gerekmektedir. Özellikle *in vivo* çalışmalarda LPS aracılı inflamasyonun uyarılmasında çeşitli yaklaşımlar kullanılabilir. LPS intraserebroventriküler (i.c.v.) şekilde SSS'ye veya periferik tek veya çoklu enjeksiyonlarla enjekte edilebilmektedir. Bunun yanı sıra oral, intraventriküler ya da i.p. olarak uygulandığı çalışmalar da mevcuttur. Bu nedenle etkileri ve uygulama protokolleri değişebilmektedir. Ratlarda gerçekleştirilen çalışmada tek i.c.v. LPS enjeksiyonunun, enjeksiyondan 2 saat sonra ratların beyin sapı ve diensefalonunda ve enjeksiyondan 6 saat sonra beyincik hariç tüm beyin bölgelerinde IL-1 β seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (233). Bir başka çalışmada 1 mg/kg, i.p. enjeksiyonunun dozunda LPS enjeksiyonunun ratlarda nöroinflamasyonu indüklediği ve hipokampal IL-1 β düzeylerinde belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir (234). Yavuz ve arkadaşları, gebe ratlara uygulanan 1 mg/kg, i.p. LPS enjeksiyonunun preterm koryoamniyotik modelini indüklediği ortaya koymuştur (12). Literatürdeki bu bilgilerden hareketle bizde çalışmamızda 1 mg/kg, i.p. LPS enjeksiyonuyla 6 saatlik akut inflamasyon modeli oluşturuldu. Literatürdeki bulgularla uyumlu olarak 1 mg/kg, i.p. LPS enjeksiyonunu takiben geçen 6 saatlik süre zarfı sonucunda sakrifiye edilen annelere ait fetüslerin fetal beyin dokularında TNF- α , IL-1 β düzeylerinde, NF- κ B ve p(Ser536)-NF- κ B protein ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu belirlendi (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.8., Şekil 4.12., Şekil 4.13.). Elde ettiğimiz bu bulgular deney modelimizde LPS ile indüklenen inflamasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğruladı.

Ayrıca histopatoloji bulgularımızda da inflamasyonun gerçekleştiği doğrulanmıştır ve LPS uygulanan gruba ait fetal beyin dokularında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde, konjesyon-hemoraji bulgularında artış olduğunu gösterdi. Plasenta dokularına ait bulgulara ise yine LPS grubuna ait dokuların bazal zonunda konjesyon-hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularında, labirent zonda ise trofoblastik hücre dejenerasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış meydana geldiği gözlemlendi.

İnflamasyonun moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızda, NF- κ B'nin fosforilasyonu incelendi. NF- κ B/Rel ailesi NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB ve c-Rel'i içerir (235). NF- κ B/Rel proteinleri doğal ve adaptif bağışıklık, inflamasyon, stres yanıtları çeşitli biyolojik süreçleri etkileyen genlerin ifade düzeylerini düzenleyen dimerik transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmektedir. NF- κ B'nin en yaygın aktive formu, gen indüksiyonu için gerekli transaktivasyon alanlarını içeren bir p50 veya p52 alt birimi ve p65'ten oluşan bir heterodimerdir. Klasik (veya kanonik) yolda, NF- κ B/Rel proteinleri inhibitör kabba B (I κ B) proteinleri tarafından bağlanır ve inhibe edilir. Proinflamatuvar sitokinler, LPS, büyüme faktörleri ve antijen reseptörleri, I κ B proteinlerini fosforile eden bir IKK (I κ B kinaz) kompleksini aktive eder. I κ B'nin fosforilasyonu, ubiquitinasyonuna ve proteazomal degradasyona yol açarak NF- κ B/Rel komplekslerini serbest bırakır. Aktif NF- κ B/Rel kompleksleri post-translasyonel modifikasyonlarla (fosforilasyon, asetilasyon, glikozilasyon) daha da aktive edilir (236,237).

NF- κ B aracılı kontrol edilen transkripsiyonel programın hedefleri arasında anti-apoptotik proteinler (Fas, Bcl-2, Survivin), sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), kemokinler (MCP-1, IL-18, MIP-2), hücre döngüsü düzenleyicileri (Bcl-2L1, siklin), adezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1, ECAM-1) ve bunların aracılık ettiği survival, proliferasyon, adezyon, invazyon ve anjiyogenez süreçleri yer almaktadır (9).

NF- κ B, proinflamatuvar gen ekspresyonunun major düzenleyicilerinden biridir ve inflamatuvar sinyalin en önemli mediyatörleri olan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin sentezini koordine etmektedir (238). İmmün sistem hastalıkları ve ateroskleroz gibi inflamatuvar hastalıkların yanı sıra kanser ve nörodejenerasyonda da kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar NF- κ B'nin sinir sistemindeki rolüne dikkat çekmiştir. NF- κ B'nin birçok organizmada öğrenme ve bellek için önemli olduğunu gösterilmiştir. NF- κ B'nin, kısmen sinaptik plastisiteyi, sinaps fonksiyonunu ve ayrıca dendritlerin büyümesini düzenleyerek öğrenme ve belleği düzenleyebileceği gösterilmiştir. NF- κ B, TLR'ler ve antijen reseptörleri gibi immünoresseptörlerden sitokin ve büyüme faktörü reseptörlerine ve ayrıca fiziksel, oksidatif ve genotoksik strese kadar çok çeşitli uyaranlar tarafından aktive

edilebilmektedir (239). BV-2 mikrogliya hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışma, LPS ile indüklenen BV-2 mikrogliya hücrelerinde NF- κ B p65 ve p-NF- κ B p65 ifade düzeylerinde artışa neden olduğunu gösterilmiştir (240).

Çalışmalarımızda gebelikte LPS aracılı uyarılan inflamasyonun fetal beyinde NF- κ B transkripsiyonel program üzerindeki etkisini test etmek amacıyla NF- κ B'nin fetal beyin dokularındaki total ve serin 536 pozisyonunda fosforile olan NF- κ B p65 protein düzeylerini immünoiblottlama ile inceledik. Bulgularımız, LPS ile sistemik inflamasyon oluşturulan gebe ratlara ait fetüslerin fetal beyin dokularında kontrol grubuna kıyasla LPS indüksiyonunun NF- κ B'nin serine 536 pozisyonunda fosforilasyonuna dolayısıyla aktivasyonuna yol açarak hem total NF- κ B ve hem de p(Ser536)-NF- κ B ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artışa neden olduğunu gösterdi (Şekil 4.5.).

Aktive olan NF- κ B'nin devamında aktive olan protein komponentlerinin koordine ettiği transkripsiyonel programın ürünleri olan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini arttığı bilinmektedir. I κ B- α 'nın fosforilasyonunun, NF- κ B'nin I κ B- α 'dan ayrılmasıyla sonuçlanarak heterodimerin çekirdeğe translokasyonuna neden olduğu ve IL-1 β , IL-6, TNF- α ve COX-2 gibi pro-inflamatuar genlerin promotörlerine bağlanmasına izin verdiği bilinmektedir (241). Bulgularımız doğrultusunda, LPS grubuna ait fetal beyin dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile incelenen TNF- α düzeylerinde meydana gelen artış ve bununla paralel şekilde yine bu gruba ait dokularda serolojik olarak ölçülen IL-1 β düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelen artış (1.21 kat) (Şekil 4.8.), bu durumun NF- κ B transkripsiyonel programı aktivasyonu aracılı olduğunu düşündürdü.

CBD'nin sentetik bir türevi olan dimetilheptil-kannabidiol (DMH-CBD)'ün 5 ve 10 μ M dozlarında LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında, bazal IL-1 β , IL-6 ve TNF mRNA düzeylerini downregüle ettiği gösterilmiştir (242). Yapmış olduğumuz çalışmada, bulgularımız doğrultusunda LPS indüksiyonu sonucu artan IL-1 β ve TNF- α düzeyleri CBD uygulanan, LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında doz bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmesi literatürle paralellik gösterdi. Kozela ve arkadaşları yapmış

oldukları çalışmada LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında 1, 5 ve 10 μ M CBD'nin doz bağımlı olarak IL-1, IL-6 ve IFN proinflatuar sitokin seviyelerini LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğünü göstermişlerdir. Ayrıca yine aynı çalışmada CBD'nin doz bağımlı NF- κ B p65 alt birim fosforilasyonunu düşürerek NF- κ B sinyal mekanizmasının aktivitesini baskıladığı bulunmuştur (189). İmmüno blotlama bulgularımız, total NF- κ B protein ifade düzeylerinin yine doz bağımlı şekilde LPS grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığını, serine 536 pozisyonunda fosforile formu olan p(Ser536)-NF- κ B protein ifade düzeylerinin LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalması literatürle paralellik gösterdi. Bulgularımız, anti-inflatuar etkileri bilinen CBD'nin gebelikte LPS ile indüklenen sistemik inflamasyon modelinde fetal beyinde meydana gelen nöroinflamasyonda da anti-inflatuar etki göstererek koruyucu etkisi olabileceğini düşündürdü.

İnflamasyon durumunun fetal beyinde gerçekleşen nöroinflamasyon ve nöroenez üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yapmış olduğumuz immüno blotlama çalışmalarında fetal beyin dokularında GFAP, S100B ve CREB protein ifade düzeyleri incelendi.

İnflatuar astrositlerin nörolojik hastalıkların inflammatuar ve nörodejeneratif mekanizmalarında rol oynadığı gösterilmiştir (89). Yaklaşık 50 kDa ağırlığında olan GFAP, esas olarak SSS'de hemostazisi sağlayan astrositlerde bulunan 8-9 nm çapında bir ara filament proteinidir (243). Bu proteinin insanda ve ratlarda esas olarak beyin dokularında ifade edildiği ve ifade düzeyinin 2, 6, 21 ve 104 haftalık rat beyin dokularında gradient şekilde arttığı bilinmektedir. GFAP'ın normal sinir sisteminde özel bir katkısı yoktur, ancak glial skarda ve astrositlerin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (244). Glial hücreler ve özellikle astrositler aktivasyon ve proliferasyon yoluyla glial skarlar oluşturur (89). Aktive olan astrositler, yaralanma, iskemi, KBB hasarı, inflammatuar reaksiyon, anormal metabolizma ve oksidatif stres tarafından uyarılan çeşitli inhibitör faktörler salgılayarak, MSS'de akson rejenerasyonunu ve nörolojik fonksiyonun iyileşmesini kritik bir şekilde etkileyebilmektedir (245). GFAP ifade düzeyinin artması astrosit aktivasyonunun en önemli belirteçlerinden biridir ve düzeyinin azalması lokal inflammatuar yanıtın önemli ölçüde arttığının göstergesidir. GFAP'ı da içeren astrosit

ara filament protein sisteminin sadece hücre iskeletinin önemli bir bileşeni değil, aynı zamanda çeşitli stres koşullarına yanıt veren ve çoklu proteinler aracılığıyla hücre boyutunu, göçünü ve hayatta kalmasını düzenleyen hayati bir sinyal sistemi olduğu bilinmektedir (97). Nöroinflamasyon, iskemik beyin hasarı, hipoksi ve nörodejenerasyon gibi durumlar altında GFAP ifade düzeylerinin arttığı bilinmektedir. *In vivo* çalışmada, LPS uygulanan farelerin serebral korteksinde GFAP'ın upregüle olduğu gösterilmiştir ve GFAP düzeyinin artışı nöroglial hücreler tarafından salıverilen inflamatuvar sitokinlerle ilişkilendirilmiştir (246). Bizde çalışmalarımızda gebelikte LPS ile indüklenen inflamasyonun fetal beyinde astrosit aktivasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla GFAP düzeylerini immünoiblotlama ile inceledik. Bulgularımız, LPS uygulanan gruba ait fetal beyin dokularında GFAP ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini gösterdi (Şekil 4.6.). Bu durum, annede gerçekleşen akut inflamasyonun fetal beyinde nöroinflamasyonu tetikleyebileceğini ve pro-inflamatuvar sitokinlerin düzeyinde gelen artışla ilgisi olabileceğini doğruladı.

S100 proteinleri hücre gelişimi, hücre döngüsü süreci, transkripsiyon ve farklılaşma gibi çeşitli hücresel olayları düzenleyen 8-12 kDa ağırlığında proteinlerdir (247). Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin en büyük temsilcisi olan S100 proteinleri ilk olarak 1960'ların ortalarında izole edilmiştir ve başlangıçta sinirlere özgü olarak tanımlanmıştır (248). Daha sonra yapılan çalışmalar, insanlarda ve diğer omurgalı canlılarda S100'ün çeşitli sinir dokularında ve diğer dokularda da ifade edildiğini göstermiştir (103). Yapısal olarak ' α ' ve ' β ' olarak tanımlanan sırasıyla 'A' ve 'B' olarak adlandırılan iki alt birimden oluşan bir dimerdir ve α - α , α - β ve β - β şeklinde üç izoform oluşturur. Bunlardan α - β (S100A) ve β - β (S100B) alt birimleri en yaygın olanlarıdır (249). Bu proteinler çeşitli hücre tiplerinde yaygın olarak dağılmıştır. S100A alt birimi genel olarak iskelet kası, miyokard, karaciğer, akciğer, böbrek ve pankreasta dağılmıştır, pH, su-elektrolit dengesinde ve kan basıncı düzenlenmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (106,250). S100B ise ağırlıklı olarak SSS'deki astrositlerin sitoplazmasında ve daha az oranda nöronlarda, mikrogial, oligodendrositler ve kondrositler, melanositler, adipositler, oligodendrositler, iskelet ve kalp kası hücreleri gibi çeşitli hücre ve doku türlerinde ifade edilen glial hücreler tarafından sentezlenen asidik bir proteindir (250).

S100B, yaklaşık 11 kDa ağırlığında bir proteindir ve aynı zamanda hücre içi ve hücre dışı düzenleyici faaliyetlerde rol oynayan SSS astrositlerine özgün bir alt birimidir (108,109). S100B proteini, insanlarda ve ratlarda başta beyin dokusu olmak üzere, yağ dokusu, adrenal bez, karaciğer, akciğer, böbrek ve testis gibi çeşitli dokularda ifade edilmektedir. Rat beyin dokularında ifade düzeyinin 2, 6, 21 ve 104 haftalarda gradient şekilde arttığı gösterilmiştir (110). Kalsiyum homeostazında önemli role sahip olan S100B, hipoksi ve oksidatif strese karşı hassas olması nedeniyle nöronal hasar için dolaylı bir belirteç olarak kabul edilmiştir (251). Yapılan çalışmalar, nörotrofik protein S100B'nin nöroplastisiteye, nörojeneze ve beyin hasarını takiben diğer hücreyel olaylara katıldığını göstermiştir (252,253). S100 ailesinin üyelerinin gen ifadesindeki değişiklikler, Down sendromu, Alzheimer hastalığı, kronik inflamasyon, kistik fibrozis, sedef hastalığı ve epilepsi gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte travmatik beyin hasarı, iskemi ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak beyinde gerçekleşen çeşitli patolojik durumlarda hücre dışı S100B seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Nanomolar konsantrasyonlarda, S100B nöroprotektif ve nörotrofik özellikler taşıırken daha yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkilerle ilişkilendirilmiştir (254).

S100B'yi aşırı eksprese eden transgenik fare modelleri ilk olarak dejeneratif etkilerini incelemek için geliştirilmiştir ve S100B'nin beyin hasarı ve nörodejeneratif hastalıkların bir belirteci olduğu fikri öne sürülmüştür (255-258). BDNF gibi nörojenezi upregüle eden büyüme faktörlerine ek olarak, S100B beyin hasarı sonrası hipokampal ağ onarımına ve gelişim sırasında hafıza konsolidasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Kemirgenlerde yapılan çalışmada, S100B ile akut intratekal ve intraperitoneal tedavinin hipokampal nörojenezi ve bilişsel işlevi desteklediği gösterilmiştir. İnsan beyinde bulunan S100 proteinlerinin %96'sını oluşturduğu bilinen S100B proteininin (259), çalışmamızda gebelikte LPS ile oluşturulan inflamasyonun fetal beyinde nöroenez üzerinde etkisini değerlendirmek amacıyla immünoablottlama yöntemiyle S100B ifade düzeyini inceledik. Bulgularımız, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla S100B protein ifade düzeylerinde artış meydana gelmesine karşın, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdi (Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

CREB, cAMP yanıt elemanları aracılığıyla tüm organlarda yaygın olarak ifade edilen, hücre çoğalması, büyüme, hayatta kalma ve farklılaşma gibi fizyolojik süreçler için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (119). CREB, 43 kDa ağırlığında bir protein olup, insanlarda ve ratlarda beyin, kolon, kalp, karaciğer, akciğer ve testis gibi çeşitli dokularda ifade edilmektedir. Bununla birlikte 2 haftalık rat beyin dokularında, CREB ifade düzeyinin 6, 21 ve 104 haftalık beyin dokularına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (117,118). CREB çok sayıda fizyolojik uyaran tarafından gelen sinyallere aracılık edebilir ve hücresel yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir. Birçok dokuda ifade edilen CREB'in, özellikle sinir sisteminde nöronal sağkalım, proliferasyon ve nöronal farklılaşmanın desteklenmesi gibi düzenleyici rolleri olduğu bilinmektedir (120,260,261). Bunlara ek olarak CREB'in yer aldığı sinyal mekanizmasının çeşitli organizmalarda öğrenme ve bellek ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (262,263). Yapılan çalışmalar, CREB'in aracılık ettiği gen ifadesinin uzun süreli bellek ve sinaptik plastisite için gerekli olduğunu ve öğrenme ve belleğin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması için önemli bir hedef olduğunu göstermiştir (264,265). Bununla birlikte CREB sinyalizasyonunun downregülasyonunun Alzheimer hastalığında bilişsel bozukluğun altında yatan mekanizmalardan biri olabileceği ortaya konulmuştur (266).

Nöroinflamasyon sürecinin fetal beyin üzerindeki nöronal sağkalım ve proliferasyon etkilerini değerlendirmek amacıyla CREB düzeylerini inceledik. Bulgularımız, LPS uygulanan gruba ait fetal beyin dokularında CREB düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğunu gösterdi. Bu sonuç, inflamasyon aracılı ortaya çıkan KBB'ye zarar veren ve mikroglyal hücreleri ve astrositleri aktive eden proinflamatuvar sitokinlerle ilişkili olabileceğini düşündürdü.

CBD'nin fetal beyinde gerçekleşen nöroinflamasyon ve nörogenez süreci üzerindeki etkisini değerlendirildi. Daha önce yapılan çalışma, kannabis ya da Δ^9 -THC'nin patolojik koşullar altında beyinde S100B ifade düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (267). Bulgularımız literatürle benzer şekilde CBD uygulanan LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında S100B ifade düzeylerinde azalma olduğunu gösterdi. LPS+CBD 5mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında meydana gelen azalmanın doz bağımlı olduğu, LPS+CBD

10mg/kg grubundaki azalmanın ise diğer gruplara kıyasla daha az oranda olduğu bulundu. Bununla birlikte azalan S100B ifade düzeyleriyle birlikte NF- κ B ifade düzeyleri ve fetal beyin dokularında immün boyama sonucu TNF- α düzeylerinde de azalma meydana gelmesi literatürle paralellik gösterdi (Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

Hücre iskeletinin sağlanmasında önemli bir rolü olduğu bilinen astrositlerde, glial filamentlerin ana protein bileşeni olan GFAP düzeyindeki artışın beyin hasarı sonucu gerçekleşen glial hücre aktivasyonunun önemli belirteci olduğu bilinmektedir. Mikroglia ve astrositlerin kannabinoid reseptörlerini ifade ettiği bilinmektedir. Kronik THC tedavisi uygulanan ratlara ait hipokampus ve parietal korteks dokularında GFAP düzeylerinde artış görülmüştür (Şekil 4.5, Şekil 4.6.) (268). Bulgularımız, CBD uygulanan LPS+CBD 5mg/kg, LPS+CBD 10mg/kg ve LPS+CBD 30mg/kg gruplarında GFAP ifade düzeylerinde doz bağımlı azalma meydana geldiğini gösterdi.

Bu çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular, gebelikte LPS'ye bağlı olarak gelişen inflamasyon sürecinde, farklı dozlarda CBD uygulamalarıyla, fetal beyinde inflamasyon aracılı artan NF- κ B, p(Ser536)-NF- κ B, IL-6 ve TNF- α ifade düzeylerini baskılayarak inflamasyon sürecini baskıladığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, CBD uygulaması nöroinflamasyon ve nörogenez sürecinin önemli belirteçleri olan, S100B, GFAP ve CREB protein ifade düzeylerinde de azalmaya yol açmıştır.

Toplu olarak sonuçlarımız, CBD'nin erken doğum yapma eğilimi olan gebe kadınlarda enfeksiyon, inflamasyon ya da her ikisiyle ilişkili bir durum olan ve annede ateş, lökositoz, taşikardi, uterusu hassasiyet ve erken membran rüptürüne eşlik eden fetal membranların iltihaplanma durumlarıyla karakterize koryoamniyonit (269,270) ve benzeri inflamasyon kaynaklı durumlarda fetal beyinde nöroinflamasyon ve nörogenez süreçlerinde koruyucu etkisi olabileceğini önerdi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular sonucunda, 1mg/kg i.p. LPS enjeksiyonunun gebe ratlarda inflamasyonu indüklediği fetal beyin dokularında gerçekleştirilen histopatolojik incelemeler, immünohistokimyasal ve immünoiblottama yöntemleriyle belirlendi. Elde edilen histopatolojik incelemelerde, fetal beyin dokularında inflamasyon ile konjesyon-hemoraji bulguları ve bununla birlikte plasenta dokularında bazal zonda konjesyon-hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulguları, labirent zonda ise trofoblastik hücre dejenerasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu bulguları olduğu tespit edildi. Ayrıca inflamasyonun gerçekleştiği, immünohistokimyasal boyama ile fetal beyin dokularında TNF- α düzeylerinde artış ile de doğrulandı.

Gebelikte meydana gelen inflamasyonun fetal beyinde meydana gelen nöroinflamasyon ve nörogenez süreçlerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen immünoiblottama bulgularımız sonucunda total NF- κ B ve p(Ser536)-NF- κ B ifade düzeylerinin beklenildiği gibi inflamasyon oluşturulan grupta arttığı tespit edildi. Bununla birlikte, fetal beyin dokularında IL-1 β düzeylerinde de artış olduğu belirlendi. Bu bulgular, LPS indüksiyonunun NF- κ B sinyal mekanizmasının uyarılarak inflamatuvar sitokin seviyelerinde artışa yol açabileceğini önerdi.

İnflamasyonun fetal beyinde nöroinflamasyon ve nörogenez süreci üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, inflamasyonun astrosit belirteçleri olan GFAP ve S100B düzeylerinde artışa yol açtığı belirlendi. Bunlarla beraber önemli bir transkripsiyon faktörü olan ve nöronal sağkalım, plastisite, öğrenme-bellek gibi fizyolojik süreçlerde rolü olan CREB düzeyinde de inflamasyona bağlı olarak artış olduğu belirlendi.

CBD'nin gebelikte inflamasyon sürecinde nöroinflamasyon ve nörogenez üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular, CBD'nin 30mg/kg dozunda anlamlı ölçüde olmakla birlikte her üç dozda da, fetal beyin dokularında inflamasyon sonucu incelenen konjesyon-hemoraji, ödem ve meninkslerde kanama bulgularına ait skorları gerilettiği tespit edildi. Plasenta dokularına ait trofoblastik hücre dejenerasyonu ve mononükleer hücre

infiltrasyonu bulgularına ait skorların CBD'nin 30mg/kg dozunda anlamlı olmak üzere 10mg/kg ve 30mg/kg dozlarıyla önemli ölçüde azaldığı tespit edildi. Ayrıca fetal beyin dokularında TNF- α immün boyama bulgularında CBD uygulamasıyla birlikte azaldığı belirlendi.

CBD'nin inflamasyon sürecinin önemli moleküler sinyal mekanizmalarından biri olan NF- κ B üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapmış olduğumuz immünoiblota çalışmaları, CBD'nin doz bağımlı olarak fetal beyin dokusunda inflamasyon sonucu artan total NF- κ B ve p(Ser536)-NF- κ B ifade düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığını gösterdi. İnflamasyon sonucu arttığı belirlenen IL-1 β düzeylerinin de CBD uygulamalarıyla doz bağımlı şekilde azalması, inflamasyon sonucu aktive olan NF- κ B sinyal mekanizması ve bunun sonucunda artan inflamatuvar sitokin düzeylerinin CBD uygulamasıyla baskılandığını ortaya koydu. Bu bulgular, CBD'nin gebelikte inflamasyon sonucu fetal beyinde gerçekleşen nöroinflamasyon sürecinde anti-inflamatuvar etkisi olabileceğini önerdi.

CBD'nin nöroinflamasyon sonucu aktive olan astrositlerin önemli belirteçleri olan GFAP ve S100B proteinlerinin ifade düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz immünoiblota çalışmamıza ait bulgular, inflamasyonla artan GFAP ve S100B protein ifade düzeylerinin CBD uygulamasıyla azaldığını ortaya koydu.

Bundan sonraki yapılacak olan çalışmalarda, CBD'nin NF- κ B aracılı sinyal mekanizması üzerindeki etkisinin daha detaylı anlaşılabilmesi amacıyla, TLR4 reseptör düzeylerinin, total I κ B α ve fosforile-I κ B α ifade düzeylerinin de araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, yapılacak olan *in vivo* çalışmaların öncesinde uygun hücre hattı kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmaların uygun dozun belirlenmesinde katkısı olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, CBD'nin fetal nöroprotektif etkisi olduğu düşünülen MgSO₄, folik asit, melatonin veya N-asetil sistein gibi diğer ajanlar ile kombine uygulamalarının *in vitro* veya *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, CBD'nin olası nöroprotektif etkinliğini artıracaklarını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. 2013;10 Suppl 1(Suppl 1):S2.
2. Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol*. 2017;41(7):387–91.
3. Markopoulou P, Papanikolaou E, Analytis A, Zoumakis E, Siahianidou T. Preterm Birth as a Risk Factor for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease in Adult Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pediatr*. 2019;210:69–80.e5.
4. Arpino C, Compagnone E, Montanaro ML, Cacciatore D, De Luca A, Cerulli A, et al. Preterm birth and neurodevelopmental outcome: a review. *Childs Nerv Syst*. 2010;26(9):1139–49.
5. Goedicke-Fritz S, Härtel C, Krasteva-Christ G, Kopp MV, Meyer S, Zemlin M. Preterm Birth Affects the Risk of Developing Immune-Mediated Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:1266.
6. Sonnenschein-van der Voort AM, Arends LR, de Jongste JC, Annesi-Maesano I, Hasan Arshad S, Barros H, et al. Preterm Birth, Infant Weight Gain, and Childhood Asthma Risk: A Meta-analysis of 147,000 European Children. 2015.
7. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2006;11:317–26. <http://doi.org/10.1016/j.siny.2006.05.001>
8. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771–6.
9. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:1-9.
10. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:129–70.
11. Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, López-Requena A, Voets T, Talavera K. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium*. 2018;73:72–81.
12. Yavuz A, Sezik M, Eris Yalcin S, Asci H, Ozmen O. Immunohistochemical analysis of protective effects of maternal fingolimod on the placenta and fetal lung and brain in chorioamnionitis-induced preterm birth rat model. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2020;42(6):564–71.
13. Ozen M, Xie H, Shin N, Al Yousif G, Clemens J, McLane MW, et al. Magnesium sulfate inhibits inflammation through P2X7 receptors in human umbilical vein endothelial cells. *Pediatr Res*. 2020;87(3):463–71.

14. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2014;20(2):293–307.
15. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*. 2011;36(2):78–86.
16. van Gool JD, Hirche H, Lax H, De Schaepdrijver L. Folic acid and primary prevention of neural tube defects: A review. *Reprod Toxicol*. 2018;80:73–84.
17. Cassano T, Villani R, Pace L, Carbone A, Bukke VN, Orkisz S, et al. From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front Pharmacol*. 2020;11:124.
18. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci*. 2016;7:19.
19. Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep*. 2016;33(12):1357–92.
20. Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Menacker F, Park MM, Sutton PD. Births: final data for 2001. *Natl Vital Stat Rep*. 2002;51(2):1–102.
21. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol*. 2001;28(4):721–34.
22. Silverman RK, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns*. 1998;5(4):181.
23. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*. 2010;88(1):31–8.
24. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(6):590–600.
25. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760–5.
26. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth. *Obstetric Anesthesia Digest*. 2009;29:6–7.
27. Silwedel C, Speer CP, Glaser K. Ureaplasma-associated prenatal, perinatal, and neonatal morbidities. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(11):1073–87.
28. Jonakait GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(7):415–25.
29. Prins JR, Eskandar S, Eggen BJL, Scherjon SA. Microglia, the missing link in maternal immune activation and fetal neurodevelopment; and a possible link in preeclampsia and disturbed neurodevelopment?. *Journal of Reproductive Immunology*. 2018;126:18–22. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2018.01.004>

30. Schepanski S, Buss C, Hanganu-Opatz IL, Arck PC. Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life. *Front Immunol.* 2018;9:2186.
31. Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental Outcome at 2 Years for Preterm Children Born at 22 to 34 Weeks' Gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 Cohort Study. *Obstetric Anesthesia Digest.* 2018;38:38–9. <http://doi.org/10.1097/01.aoa.0000530002.37979.4c>
32. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2008;371(9615):813–20.
33. Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2004;18:425–36. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.02.011>
34. Burd I, Balakrishnan B, Kannan S. Models of Fetal Brain Injury, Intrauterine Inflammation, and Preterm Birth. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2012;67:287–94. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01110.x>
35. Angelidou A, Asadi S, Alysandratos KD, Karagkouni A, Kourembanas S, Theoharides TC. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-review and proposal. *BMC Pediatr.* 2012;12:89.
36. Fichorova RN, Beatty N, Sassi RRS, Yamamoto HS, Allred EN, Leviton A, et al. Systemic inflammation in the extremely low gestational age newborn following maternal genitourinary infections. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(2):162–74.
37. Galea I, Bechmann I, Hugh Perry V. What is immune privilege (not)? . *Trends in Immunology.* 2007;28:12–8. <http://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.004>
38. Meyer U, Feldon J, Dammann O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res.* 2011;69(5 Pt 2):26R – 33R.
39. Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol.* 2012;71(4):444–57.
40. Dammann O, Michael O'Shea T. Cytokines and Perinatal Brain Damage. *Clinics in Perinatology.* 2008;35:643–63. <http://doi.org/10.1016/j.clp.2008.07.011>
41. Malaeb S, Dammann O. Fetal Inflammatory Response and Brain Injury in the Preterm Newborn. *Journal of Child Neurology.* 2009;24:1119–26. <http://doi.org/10.1177/0883073809338066>

42. Kuban KCK, Joseph RM, O'Shea TM, Heeren T, Fichorova RN, Douglass L, et al. Circulating Inflammatory-Associated Proteins in the First Month of Life and Cognitive Impairment at Age 10 Years in Children Born Extremely Preterm. *J Pediatr*. 2017;180:116–23.e1.
43. Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in Neurobiology*. 2019;175:1–19. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>
44. Weber-Stadlbauer U. Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. *Translational Psychiatry*. 2017;7:e1113–e1113. <http://doi.org/10.1038/tp.2017.78>
45. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772–7.
46. Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(11):643–60.
47. Fatemi SH, Pearce DA, Brooks AI, Sidwell RW. Prenatal viral infection in mouse causes differential expression of genes in brains of mouse progeny: a potential animal model for schizophrenia and autism. *Synapse*. 2005;57(2):91–9.
48. Meyer U. Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry*. 2014;75(4):307–15.
49. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):158–75.
50. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4:499–511 <http://doi.org/10.1038/nri1391>
51. Liu J, Buisman-Pijlman F, Hutchinson MR. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci*. 2014;8:309.
52. Afkham A, Eghbal-Fard S, Heydarlou H, Azizi R, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Toll-like receptors signaling network in pre-eclampsia: An updated review. *J Cell Physiol*. 2019;234(3):2229–40.
53. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010;33(4):861–8.
54. Qu X, Yu X, Liu J, Wang J, Liu J. Pro-Inflammatory Cytokines are Elevated in Pregnant Women with Systemic Lupus Erythematosus in Association with the Activation of TLR4. *Clin Lab*. 2016;62(4):535–44.
55. Kuzmicki M, Telejko B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Lipinska D, Pliszka J, Wilk J, et al. The expression of genes involved in NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(3):419–27.

56. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695–702.
57. Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016;351(6276):933–9.
58. Graham AM, Rasmussen JM, Rudolph MD, Heim CM, Gilmore JH, Styner M, et al. Maternal Systemic Interleukin-6 During Pregnancy Is Associated With Newborn Amygdala Phenotypes and Subsequent Behavior at 2 Years of Age. *Biol Psychiatry*. 2018;83(2):109–19.
59. Meyer U, Feldon J, Yee BK. A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2009;35(5):959–72.
60. Mouihate A. Prenatal Activation of Toll-Like Receptor-4 Dampens Adult Hippocampal Neurogenesis in An IL-6 Dependent Manner. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;10. <http://doi.org/10.3389/fncel.2016.00173>
61. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649–83.
62. Dobbing J. Undernutrition and the Developing Brain: the use of Animal Models to Elucidate the Human Problem. *Normal and Abnormal Development of Brain and Behaviour*. 1971; 20–38. http://doi.org/10.1007/978-94-010-2921-6_2
63. Allen E. Studies on cell division in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). III. Spermatogenesis: The origin of the first spermatocytes and the organization of the chromosomes, including the accessory. *Journal of Morphology*. 1918;31:133–85. <http://doi.org/10.1002/jmor.1050310107>
64. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319–35.
65. Altman J, Das GD. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature*. 1967;214(5093):1098–101.
66. Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, et al. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*. 2018;23(1):25–30.
67. Jin X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *European Journal of Neuroscience*. 2016;44: 2291–9. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13251>
68. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013;106-107:1–16.
69. Burns EM, Richards JG, Kuhn H. An ultrastructural investigation of the effects of perinatal malnutrition on E-PTA-stained synaptic junctions. *Experientia*. 1975;31:1451–3. <http://doi.org/10.1007/bf01923239>

70. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415(6875):1030–4.
71. Toni N, Schinder AF. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016;8:a018903. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
72. Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2009;33:232–52.
73. Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):385–95.
74. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):5263–7.
75. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(4):554–60.
76. Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2013;39:3–18. <http://doi.org/10.1111/nan.12011>
77. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS Development. *Neuron*. 2009;64: 61–78. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>
78. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367–402.
79. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):483–95.
80. Belarbi K, Rosi S. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:145.
81. Eggen BJL, Raj D, Hanisch UK, Boddeke HWG. Microglial Phenotype and Adaptation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013;8: 807–23. <http://doi.org/10.1007/s11481-013-9490-4>
82. Cameron HA, Hazel TG, McKay RDG. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *Journal of Neurobiology*. 1998;36: 287–306.
83. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):137–49.
84. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1439–51.
85. Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium*. 1991;12:713–26. [http://doi.org/10.1016/0143-4160\(91\)90040-l](http://doi.org/10.1016/0143-4160(91)90040-l)

86. Li D, Liu X, Liu T, Liu H, Tong L, Jia S, et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia*. 2020;68(5):878–97.
87. Wang WW, Li M. [Clinical features of autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in children: an analysis of 34 cases. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2023;25(1):67–72.
88. Othman H, López-Furelos A, Leiro-Vidal JM, Ammari M, Sakly M, Abdelmelek H, et al. Exposure to 2.45 GHz Radiation Triggers Changes in HSP-70, Glucocorticoid Receptors and GFAP Biomarkers in Rat Brain. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10). <http://doi.org/10.3390/ijms22105103>
89. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32(12):638–47.
90. Shu M, Zhou Y, Zhu W, Wu S, Zheng X, Yan G. Activation of a pro-survival pathway IL-6/JAK2/STAT3 contributes to glial fibrillary acidic protein induction during the cholera toxin-induced differentiation of C6 malignant glioma cells. *Mol Oncol*. 2011;5(3):265–72.
91. Hlavac N, VandeVord PJ. Astrocyte Mechano-Activation by High-Rate Overpressure Involves Alterations in Structural and Junctional Proteins. *Front Neurol*. 2019;10:99.
92. Ito K, Noguchi A, Uosaki Y, Taga T, Arakawa H, Takizawa T. and regulation by BRG1 and STAT3 via interchromosomal gene clustering in astrocytes. *Mol Biol Cell*. 2018;29(2):209–19.
93. Amalia L. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): Neuroinflammation Biomarker in Acute Ischemic Stroke. Vol. 14, *Journal of Inflammation Research*. 2021;14:7501–6. <http://doi.org/10.2147/jir.s342097>
94. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:121–30.
95. Olabarria M, Goldman JE. Disorders of Astrocytes: Alexander Disease as a Model. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2017;12:131–52. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100218>
96. Lefrançois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J Neurosci*. 1997;17(11):4121–8.
97. Pekny M, Lane EB. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2244–54.
98. Choi D. Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? *Mt Sinai J Med*. 1998;65(2):133–8.
99. Bandyopadhyay S, Tfelt-Hansen J, Chattopadhyay N. Diverse roles of extracellular calcium-sensing receptor in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2010;88(10):2073–82.

100. Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:461–82.
101. Miki Y, Gion Y, Mukae Y, Hayashi A, Sato H, Yoshino T, et al. Morphologic, flow cytometric, functional, and molecular analyses of S100B positive lymphocytes, unique cytotoxic lymphocytes containing S100B protein. *Eur J Haematol.* 2013;90(2):99–110.
102. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739–744
103. Michetti F, Corvino V, Geloso MC, Lattanzi W, Bernardini C, Serpero L, et al. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem.* 2012;120(5):644–59.
104. Wheeler LC, Donor MT, Prell JS, Harms MJ. Multiple Evolutionary Origins of Ubiquitous Cu²⁺ and Zn²⁺ Binding in the S100 Protein Family. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164740.
105. Gross SR, Sin CGT, Barraclough R, Rudland PS. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(9):1551–79.
106. Li DR, Zhu BL, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Immunohistochemical distribution of S-100 protein in the cerebral cortex with regard to the cause of death in forensic autopsy. *Leg Med.* 2006;8(2):78-85
107. Snyder-Ramos SA, Gruhlke T, Bauer H, Bauer M, Luntz AP, Motsch J, et al. Cerebral and extracerebral release of protein S100B in cardiac surgical patients. *Anaesthesia.* 2004;59(4):344–9.
108. Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100b expression in and effects on microglia. *Glia.* 2001;33:131–42.
109. Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, et al. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry.* 2001;6(4):445–9.
110. Rocha M, Vieira A, Michels M, Borges H, Goulart A, Fernandes F, et al. Effects of S100B neutralization on the long-term cognitive impairment and neuroinflammatory response in an animal model of sepsis. *Neurochem Int.* 2021;142:104906.
111. Al-Ayadhi LY, Mostafa GA. A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children. *J Neuroinflammation.* 2012;9:54.
112. Grabe HJ, Ahrens N, Rose HJ, Kessler C, Freyberger HJ. Neurotrophic Factor S100beta in Major Depression. *Neuropsychobiology.* 2001;44: 88–90.
113. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, et al. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res.* 2001;35(1):11–4.

114. Akhisaroglu M, Manev R, Akhisaroglu E, Uz T, Manev H. Both aging and chronic fluoxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport*. 2003;14(11):1471–3.
115. Craft JM, Martin Watterson D, Marks A, Van Eldik LJ. Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human β -amyloid. *Glia*. 2005;51:209–16.
116. Hachem S, Laurenson AS, Hugnot JP, Legraverend C. Expression of S100B during embryonic development of the mouse cerebellum. *BMC Dev Biol*. 2007;7:17.
117. Leopold Wager CM, Bonifacio JR, Simper J, Naoun AA, Arnett E, Schlesinger LS. Activation of transcription factor CREB in human macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* promotes bacterial survival, reduces NF- κ B nuclear transit and limits phagolysosome fusion by reduced necroptotic signaling. *PLoS Pathog*. 2023;19(3):e1011297.
118. Liu C, Zhao H, Ji ZH, Yu XY. Hyperhomocysteinemia Induces Rat Memory Impairment Via Injuring Hippocampal CA3 Neurons and Downregulating cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) Phosphorylation. *Neurochem Res*. 2022;47(3):762–7.
119. Sun H, Wu H, Liu J, Wen J, Zhu Z, Li H. Prenatal Stress Impairs Spatial Learning and Memory Associated with Lower mRNA Level of the CAMKII and CREB in the Adult Female Rat Hippocampus. *Neurochem Res*. 2017;42(5):1496–503.
120. Lee MM, Badache A, DeVries GH. Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res*. 1999;55(6):702–12.
121. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, et al. Regulation of Neurogenesis in Adult Mouse Hippocampus by cAMP and the cAMP Response Element-Binding Protein. *J Neurosci*. 2002;22(9):3673–82.
122. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420:846–52.
123. Woodroffe MN. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology*. 1995;45S6–10.
124. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732–41.
125. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998; 56(3):307–40.
126. Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA2-IIA expression in astrocytes and microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2011;8.

127. Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of Neuroscience Research*. 2002;69:94–103.
128. Banks WA. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*. 2005;11(8):973–84.
129. Fenn AM, Gensel JC, Huang Y, Popovich PG, Lifshitz J, Godbout JP. Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: a role for primed microglia. *Biol Psychiatry*. 2014;76(7):575–84.
130. Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995;20(3):269–87.
131. Bilbo SD. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2009;3.
132. Domenici E, Willé DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*. 2010;5(2):e9166.
133. Song JH, Wang CX, Song DK, Wang P, Shuaib A, Hao C. Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12896–901.
134. Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(10):1265–77.
135. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 2010;58(3):253–63.
136. Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmäng A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):R1345–56.
137. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol*. 2005;75(5):321–41.
138. Ming GL, Song H. Adult Neurogenesis In The Mammalian Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*. 2005;28:223–50.
139. Myint AM, Kim YK. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;48:304–13.
140. Haour F, Jafarian-Tehrani M, Gabellec MM, Crumeyrolle-Arias M, Hu Y, Wick G, et al. Interleukin-1 receptor defect in autoimmune NZB mouse brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:755–61.
141. Parnet P, Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *J Neuroimmunol*. 2002;125(1-2):5–14.

142. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003;302(5651):1760–5.
143. Keohane A, Ryan S, Maloney E, Sullivan AM, Nolan YM. Tumour necrosis factor- α impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2010;43:127–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2009.10.003>
144. Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Grigoriadis N. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(3):623–31.
145. Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJH, Bonde S, Kokaia Z, et al. Tumour necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2006;26(38):9703–12.
146. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*. 2001;4(11):1116–22.
147. Pritchard JA, Pritchard SA. Standardized treatment of 154 consecutive cases of eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;123(5):543–52.
148. Crowther CA, Brown J, McKinlay CJD, Middleton P. Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;CD001060.
149. Nelson KB, Grether JK. Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics*. 1995;95:263–9.
150. Schendel DE. Prenatal Magnesium Sulfate Exposure and the Risk for Cerebral Palsy or Mental Retardation Among Very Low-Birth-Weight Children Aged 3 to 5 Years. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1996;276:1805.
151. Paneth N, Jetton J, Pinto-Martin J, Susser M. Magnesium sulfate in labor and risk of neonatal brain lesions and cerebral palsy in low birth weight infants. The Neonatal Brain Hemorrhage Study Analysis Group. *Pediatrics*. 1997;99(5):E1.
152. Rubin H. The paradox of the contrasting roles of chronic magnesium deficiency in metabolic disorders and field cancerization. *Magnes Res*. 2014;27(3):94–102.
153. Itoh K, Maki T, Shindo A, Egawa N, Liang AC, Itoh N, et al. Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic–ischemic injury. *Neurosci Res*. 2016;106:66–9.
154. Burd I, Breen K, Friedman A, Chai J, Elovitz MA. Magnesium sulfate reduces inflammation-associated brain injury in fetal mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(3):292.e1–9.
155. Kang SW, Choi SK, Park E, Chae SJ, Choi S, Jin Joo H, et al. Neuroprotective effects of magnesium-sulfate on ischemic injury mediated by modulating the

- release of glutamate and reduced of hyperreperfusion. *Brain Res.* 2011;1371:121–8.
156. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):181–97.
 157. Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):228–42.
 158. Husson I, Mesplès B, Bac P, Vamecq J, Evrard P, Gressens P. Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol.* 2002;51(1):82–92.
 159. Miller SL, Yan EB, Castillo-Meléndez M, Jenkin G, Walker DW. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci.* 2005;27(2-4):200–10.
 160. Hamada F, Watanabe K, Wakatsuki A, Nagai R, Shinohara K, Hayashi Y, et al. Therapeutic effects of maternal melatonin administration on ischemia/reperfusion-induced oxidative cerebral damage in neonatal rats. *Neonatology.* 2010;98(1):33–40.
 161. Kaur C, Sivakumar V, Ling EA. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res.* 2010;48(3):185–93.
 162. Miller SL, Yawno T, Alers NO, Castillo-Melendez M, Supramaniam VG, VanZyl N, et al. Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction. *J Pineal Res.* 2014;56(3):283–94.
 163. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awny M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* 2015;35(3):186–91.
 164. Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N Engl J Med.* 1988;319(24):1557–62.
 165. Durieux AMS, Fernandes C, Murphy D, Labouesse MA, Giovanoli S, Meyer U, et al. Targeting Glia with N-Acetylcysteine Modulates Brain Glutamate and Behaviors Relevant to Neurodevelopmental Disorders in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:343.
 166. Horowitz RS, Dart RC, Jarvie DR, Bearer CF, Gupta U. Placental transfer of N-acetylcysteine following human maternal acetaminophen toxicity. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1997;35(5):447–51.
 167. Lanté F, Meunier J, Guiramand J, De Jesus Ferreira MC, Cambonie G, Aimar R, et al. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus.* 2008;18(6):602–9.

168. Wiest DB, Chang E, Fanning D, Garner S, Cox T, Jenkins DD. Antenatal pharmacokinetics and placental transfer of N-acetylcysteine in chorioamnionitis for fetal neuroprotection. *J Pediatr*. 2014;165(4):672–7.e2.
169. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):1–13.
170. Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1678–92.
171. Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno MC, Muga R, et al. Cannabinoids: from pot to lab. *Int J Med Sci*. 2018;15(12):1286–95.
172. Lafaye G, Karila L, Blecha L, Benyamina A. Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(3):309–16.
173. De Luca MA, Fattore L. Therapeutic Use of Synthetic Cannabinoids: Still an OpenIssue? *Clin Ther*. 2018;40(9):1457–66.
174. Wiley JL, Marusich JA, Huffman JW, Balster RL, Thomas BF. Hijacking of Basic Research: The Case of Synthetic Cannabinoids. *Methods Rep RTI Press*. 2011. <http://doi.org/10.3768/rtipress.2011.op.0007.1111>
175. Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*. 2009;1(7):1333–49.
176. Torres OV, O'Dell LE. Stress is a principal factor that promotes tobacco use in females. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;65:260–8.
177. Alves VL, Gonçalves JL, Aguiar J, Teixeira HM, Câmara JS. The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. *Crit Rev Toxicol*. 2020;50(5):359–82.
178. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*. 2008;20 Suppl 1:10–4.
179. McGregor G, Harvey J. Regulation of Hippocampal Synaptic Function by the Metabolic Hormone, Leptin: Implications for Health and Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:340.
180. Appendino G, Chianese G, Taglialatela-Scafati O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2011;18(7):1085–99.
181. Henstridge CM. Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55. *Pharmacology*. 2012;89(3-4):179–87.
182. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*. 2017;127:624–33.
183. Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 2005;78(5):539–48.
184. Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, et al. Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J Forensic Sci*. 2010;55(5):1209–17.

185. Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep.* 2016;33(12):1357–92.
186. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2015;172(20):4790–805.
187. Pacher P, Kogan NM, Mechoulam R. Beyond THC and Endocannabinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020;60:637–59.
188. Carson MJ, Dose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews.* 2006;213(1), 48-65.
189. Cannabinoids Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Inhibit the Lipopolysaccharide-activated NF- κ B and Interferon- β /STAT Proinflammatory Pathways in BV-2 Microglial Cells. *J Biol Chem.* 2010;285(3):1616–26.
190. Muthumalage T, Rahman I. Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;382:114713.
191. Majidi F, Taheri F, Salehi P, Motaghinejad M, Safari S. Cannabinoids Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol may be effective against methamphetamine induced mitochondrial dysfunction and inflammation by modulation of Toll-like type-4 (Toll-like 4) receptors and NF- κ B signaling. *Med Hypotheses.* 2019;133:109371.
192. Meng Q, Buchanan B, Zuccolo J, Poulin MM, Gabriele J, Baranowski DC. A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196396.
193. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. *J Appl Toxicol.* 1999;19(1):7–12.
194. Zhang G, Feenstra B, Bacelis J, Liu X, Muglia LM, Juodakis J, et al. Genetic Associations with Gestational Duration and Spontaneous Preterm Birth. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1156–67.
195. Robertson SA, Moldenhauer LM. Immunological determinants of implantation success. *Int J Dev Biol.* 2014;58(2-3-4):205–17.
196. Deshmukh H, Way SS. Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:185–210.
197. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.* 2011;25(1):40–5.
198. Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(8):469–86.

199. Weir RK, Forghany R, Smith SEP, Patterson PH, McAllister AK, Schumann CM, et al. Preliminary evidence of neuropathology in nonhuman primates prenatally exposed to maternal immune activation. *Brain Behav Immun.* 2015;48:139–46.
200. Melis M, Manzoni O. *Cannabis and the Developing Brain.* Academic Press; 2022;362.
201. Iffland K, Grotenhermen F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2(1):139–54.
202. Corroon J, Kight R. Regulatory Status of Cannabidiol in the United States: A Perspective. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018;3(1):190–4.
203. Mouhamed Y, Vishnyakov A, Qorri B, Sambi M, Frank SS, Nowierski C, et al. Therapeutic potential of medicinal marijuana: an educational primer for health care professionals. *Drug Healthc Patient Saf.* 2018;10:45–66.
204. Devinsky O, Cross JH, Laux L, et al. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med.* 2017;376(21):2011–2020. doi:10.1056/NEJMoa1611618
205. Thiele EA, Marsh ED, French JA, Mazurkiewicz-Beldzinska M, Benbadis SR, Joshi C, et al. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2018;391(10125):1085–96.
206. Wagoner KG, Lazard AJ, Romero-Sandoval EA, Reboussin BA. Health Claims About Cannabidiol Products: A Retrospective Analysis of U.S. Food and Drug Administration Warning Letters from 2015 to 2019. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2021;6(6):559–63.
207. Stanciu CN, Brunette MF, Teja N, Budney AJ. Evidence for Use of Cannabinoids in Mood Disorders, Anxiety Disorders, and PTSD: A Systematic Review. *Psychiatr Serv.* 2021;72(4):429–36.
208. McAllister SD, Soroceanu L, Desprez PY. The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10(2):255–67.
209. Simmerman E, Qin X, Yu JC, Baban B. Cannabinoids as a Potential New and Novel Treatment for Melanoma: A Pilot Study in a Murine Model. *J Surg Res.* 2019;235:210–5.
210. Erzurumlu Y, Catakli D, Sezer S. Cannabidiol Negatively Regulates Androgenic Signal in Prostate Cancer Cells and Fine-Tunes the Tumorigenesis by Modulating Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation, Unfolded Protein Response, and Autophagy. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2023;33(2):316–325.
211. Brown QL, Sarvet AL, Shmulewitz D, Martins SS, Wall MM, Hasin DS. Trends in Marijuana Use Among Pregnant and Nonpregnant Reproductive-Aged Women, 2002–2014. *JAMA.* 2017;317(2):207–9.

212. Alshaarawy O, Anthony JC. Cannabis use among women of reproductive age in the United States: 2002-2017. *Addict Behav.* 2019;99:106082.
213. Volkow ND, Han B, Compton WM, McCance-Katz EF. Self-reported Medical and Nonmedical Cannabis Use Among Pregnant Women in the United States. *JAMA.* 2019;322(2):167–9.
214. Pagano C, Navarra G, Coppola L, Avilia G, Bifulco M, Laezza C. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6). <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23063344>.
215. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, et al. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2015;313(24):2456–73.
216. Lattanzi S, Brigo F, Trinka E, Zaccara G, Cagnetti C, Del Giovane C, et al. Efficacy and Safety of Cannabidiol in Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs.* 2018;78(17):1791–804.
217. Ochiai W, Kitaoka S, Kawamura T, Hatogai J, Harada S, Iizuka M, et al. Maternal and Fetal Pharmacokinetic Analysis of Cannabidiol during Pregnancy in Mice. *Drug Metab Dispos.* 2021;49(4):337–43.
218. Sun X, Dey SK. Synthetic cannabinoids and potential reproductive consequences. *Life Sci.* 2014;97(1):72–7.
219. Dong C, Chen J, Harrington A, Vinod KY, Hegde ML, Hegde VL. Cannabinoid exposure during pregnancy and its impact on immune function. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(4):729–43.
220. Callejas GH, Figueira RL, Gonçalves FLL, Volpe FAP, Zuairi AW, Crippa JA, et al. Maternal administration of cannabidiol promotes an anti-inflammatory effect on the intestinal wall in a gastroschisis rat model. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(5):e7132.
221. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Lane T, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- α . *Brain Res.* 1999;835(1):46–61.
222. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 2010;129:154–169. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x.
223. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314–8.
224. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther.* 2013;139(3):313–26.
225. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science.* 2002;296:1991–1995. doi: 10.1126/science.1067122.
226. Chevalier-Larsen E, Holzbaur ELF. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(11-12):1094–108.

227. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2):R169–76.
228. Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia.* 2019;67(6):1017–35.
229. Dos-Santos-Pereira M, Guimarães FS, Del-Bel E, Raisman-Vozari R, Michel PP. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption. *Glia.* 2020;68(3):561–73.
230. Vuolo F, Abreu SC, Michels M, Xisto DG, Blanco NG, Hallak JE, et al. Cannabidiol reduces airway inflammation and fibrosis in experimental allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2019;843:251–9.
231. Chilton PM, Embry CA, Mitchell TC. Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation. *Front Immunol.* 2012;3:154.
232. Xie Y, Meijer AH, Schaaf MJM. Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8.
233. Quan N, Sundar SK, Weiss JM. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 1994;49(1-2):125–34.
234. Vizuete AFK, Fróes F, Seady M, Zanutto C, Bobermin LD, Roginski AC, et al. Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):255.
235. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 1999;45(1):7–17.
236. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344–62.
237. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* 2006;25(51):6717–30.
238. Aupperle KR, Bennett BL, Boyle DL, Tak PP, Manning AM, Firestein GS. NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 1999;163(1):427–33.
239. Kaltschmidt B, Helweg LP, Greiner JFW, Kaltschmidt C. NF- κ B in neurodegenerative diseases: Recent evidence from human genetics. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:954541.
240. Zhang J, Zheng Y, Luo Y, Du Y, Zhang X, Fu J. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Mol Immunol.* 2019;116:29–37.

241. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.
242. Juknat A, Kozela E, Kaushansky N, Mechoulam R, Vogel Z. Anti-inflammatory effects of the cannabidiol derivative dimethylheptyl-cannabidiol - studies in BV-2 microglia and encephalitogenic T cells. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(3):289–96.
243. Cheon SY, Cho KJ, Song J, Kim GW. Knockdown of apoptosis signal-regulating kinase 1 affects ischaemia-induced astrocyte activation and glial scar formation. *Eur J Neurosci.* 2016;43(7):912–22.
244. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 2004;204(4):428–37.
245. García-Álvarez I, Fernández-Mayoralas A, Moreno-Lillo S, Sánchez-Sierra M, Nieto-Sampedro M, Doncel-Pérez E. Inhibition of glial proliferation, promotion of axonal growth and myelin production by synthetic glycolipid: A new approach for spinal cord injury treatment. *Restor Neurol Neurosci.* 2015;33(6):895–910.
246. Kang JB, Park DJ, Shah MA, Kim MO, Koh PO. Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF- κ B activation in cerebral cortex of adult mice. *Lab Anim Res.* 2019;35:19.
247. Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002;7:d1356–68.
248. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739–44.
249. Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol* 2012;19:461-482.
250. Glenney JR Jr, Kindy MS, Zokas L. Isolation of a new member of the S100 protein family: amino acid sequence, tissue, and subcellular distribution. *J Cell Biol.* 1989;108(2):569–78.
251. Gawlikowski T, Golasik M, Gomółka E, Piekoszewski W. Proteins as biomarkers of carbon monoxide neurotoxicity. *Inhal Toxicol.* 2014;26(14):885–90.
252. McAdory BS, Van Eldik LJ, Norden JJ. S100B, a neurotropic protein that modulates neuronal protein phosphorylation, is upregulated during lesion-induced collateral sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res.* 1998;813(1):211–7.
253. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agnietti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40096–105.
254. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(6):645–55.

255. Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, et al. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5359–63.
256. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(3):273–9.
257. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(19):7611–5.
258. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res*. 1994;39(4):398–404.
259. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*. 2019;148(2):168–87.
260. Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*. 2002;34(3):371–85.
261. Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron*. 2002;34(6):999–1010.
262. Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*. 1990;345(6277):718–21.
263. Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell*. 1994;79(1):49–58.
264. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 1994;79(1):59–68.
265. Won J, Silva AJ. Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(3):285–92.
266. Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, Budni J, Kim YK. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2020;257:118020.
267. Roberts RA, Aschner M, Calligaro D, Guilarte TR, Hanig JP, Herr DW, et al. Translational Biomarkers of Neurotoxicity: A Health and Environmental Sciences Institute Perspective on the Way Forward. *Toxicol Sci*. 2015;148(2):332–40.
268. Lopez-Rodriguez AB, Llorente-Berzal A, Garcia-Segura LM, Viveros MP. Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br J Pharmacol*. 2014;171(6):1435–47.

269. Peng CC, Chang JH, Lin HY, Cheng PJ, Su BH. Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol*. 2018;59(3):231–7.
270. Galinsky R, Polglase GR, Hooper SB, Black MJ, Moss TJM. The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. *J Pregnancy*. 2013; 412831.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı: Deniz ÇATAKLI

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2012-2018)

Doktora Öğrenimi : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı (2018-2021)

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2021-2023)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri düzey)

İş Denevimi

1. Doğu Akdeniz Üniversitesi Farmakognozi Anabilim dalı - Öğrenci Asistanı (2016-2018)
2. Altunbaş Eczanesi Mersin – Stajyer (2016)
3. BERKO İlaç ve Kimya San. A.Ş Kalite Kontrol Departmanı – Stajyer (2017)
4. Güzelyeniköy Eczanesi İzmir – Stajyer (2017)
5. Erasmus + Staj Hareketliliği Programı- Stajyer, Pavia Üniversitesi, İtalya (2019)
6. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi- Araştırma Görevlisi (2021-halen)

Bilimsel Yayınlar ve Çalışmalar

1. ERZURUMLU, Yalçın, Hatice Kubra Dogan, And Deniz ÇATAKLI. "Dexamethasone-stimulated glucocorticoid receptor signaling positively regulates the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) mechanism in hepatocellular carcinoma cells," Steroids, vol.195, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109238>

2. ERZURUMLU, Yalçın, Deniz ÇATAKLI, And Serdar SEZER. "Cannabidiol Negatively Regulates Androgenic Signal in Prostate Cancer Cells and Fine-Tunes the Tumorigenesis by Modulating Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation, Unfolded Protein Response, and Autophagy," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.33, no.2, 316-325, 2023

<https://doi.org/10.1007/s43450-023-00360-3>

3. ERZURUMLU, Y., Aydogdu, E., Dogan, H. K., ÇATAKLI, D., MUHAMMED, M. T., & Buyuksandic, B., (2023). 1,25(OH)₂ D₃ induced vitamin D receptor signaling negatively regulates endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and androgen receptor signaling in human prostate cancer cells. *Cellular Signalling*, vol.103.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110577>

4. ERZURUMLU, Yalçın, Hatice Kubra Dogan, And Deniz ÇATAKLI. "Progesterone regulates the endoplasmic reticulum-associated degradation and Unfolded Protein Response axis by mimicking the androgenic stimulation in prostate cancer cells," *Molecular Biology Reports* , vol.50, no.2, 1253-1265, 2023

<https://doi.org/10.1007/s11033-022-08065-x>

5. ERZURUMLU, Yalçın, Hatice Kubra Dogan, And Deniz ÇATAKLI. "Thymol Reduces the Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Inflammation by Modulating Lysosomal Stress," *Journal of Research in Pharmacy* , vol.27, no.1, 375-385, 2023

6. ERZURUMLU, Y., Dogan, H. K., ÇATAKLI, D., Aydogdu, E., & MUHAMMED, M. T., (2023). Estrogens drive the endoplasmic reticulum-associated degradation and promote proto-oncogene c-Myc expression in prostate cancer cells by androgen receptor/estrogen receptor signaling. *Journal of Cell Communication and Signaling*.

<https://doi.org/10.1007/s12079-022-00720-z>

7. Çatakli, D., Sevük, M. A., Coşan, S., İmeci, O. B., Keskin, E., Sevinç, Y. S., ... Tıkırdık, M.(2022). Ramelteon Protects Intestinal Tissue Against Injury Caused by Methotrexate Via Showing Anti-apoptotic, Antiinflammatory and Antioxidant Properties. *BEZMIALEM SCIENCE* , vol.10, no.6, 770-776.

<https://doi.org/10.14235/bas.galenos.2022.70783>

8. ERZURUMLU, Yalçın, Hatice Kübra Doğan, And Deniz ÇATAKLI. "INHIBITION OF IRE1α/XBP-1 BRANCH OF UPR BY GSK2850163 DRIVES THE SENSITIVITY TO TAMOXIFEN IN BREAST CANCER CELLS," *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol.46, no.3, 839-852, 2022

9. ERZURUMLU, Y., Dogan, H. K., ÇATAKLI, D., & Aydogdu, E., (2022). Tarantula cubensis Extract Induces Cell Death in Prostate Cancer by Promoting Autophagic Flux/ER Stress Responses and Decreased Epithelial-Mesenchymal Transition. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, vol.32, no.4, 575-582.

<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00279-1>

10. ERZURUMLU, Yalçın, And Deniz ÇATAKLI. "A23187 May Improve Tamoxifen Sensitivity of Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells," Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, vol.9, no.2, 222-227, 2022

