



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEBE FARELERDE STEROİD İLE
İNDÜKLENMİŞ PRENATAL STRES KAYNAKLI
FETAL BEYİN GELİŞİM HASARINDA
CENTELLA ASIATICA’NIN ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. DAMLA DEMİRKAYA TAŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN-2022

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEBE FARELERDE STEROİD İLE
İNDÜKLENMİŞ PRENATAL STRES KAYNAKLI
FETAL BEYİN GELİŞİM HASARINDA
CENTELLA ASIATICA’NIN ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. DAMLA DEMİRKAYA TAŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca desteğini ve yol göstericiliğini esirgemeyen, değerli hocam, tez danışmanım, Prof. Dr. Kemal ERGİN'e;

Çözüm odaklı ve destekleyici yaklaşımıyla, eğitim ve çalışma ortamının, güvenli, konforlu hale gelmesini sağlayan, yolumuzu aydınlatan, desteğini her zaman hissettiğimiz, Anabilim Dalı Başkanımız, kıymetli hocamız Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca, desteklerini her daim yanımda hissettiğim, Anabilim Dalımızın değerli hocaları, Prof. Dr. Recep KUTLUBAY, Dr. Öğrt. Üyesi H. Kübra BAŞALOĞLU, Dr. Öğrt. Üyesi K. Murat Gürses, Dr. Öğrt. Üyesi Erkan Gümüş'e; çalışma arkadaşlarım, Arş. Gör. Fulya Yılmaz, Arş. Gör. Dr. Yiğitcan ÇİFTÇİ, Arş. Gör. Dr. Ece Eraydın, Arş. Gör. Dr. Serhan ÇAMOĞLU, Arş. Gör. Dr. Celal Can GÜNGÖR'e, Arş. Gör. Esra GÖKMEN YILMAZ'a ve Yüksek Lisans Öğrencisi Eda ALTIN'a,

Hayatımın her anında desteğini yanımda hissettiğim, hayat arkadaşım Yakup TAŞ'a; varlıklarıyla bana güç veren çok değerli arkadaşlarım Begüm İNCEDEMİR ÜNDEY ve Yiğithan ÜNDEY'e ve evimizin neşesi sevgili kedimiz Ketçap'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Beyin Anatomisi ve Gelişimi.....	3
2.2 Beyin Histolojisi	5
2.3 Farede Beyin ve Santral Sinir Sistemi Gelişimi	6
2.4 Prenatal Stres.....	7
2.5 Hücre Hasarı ve Hücre Ölümü.....	10
2.6 Centella Asiatica.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	17
3.2 Genel Planlama ve Ön Deney	17
3.3 Deney Gruplarının Planlanması	17
3.4 Deneyin Sonlandırılması	18
3.5 Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi.....	19
3.6 Hematoksilen-Eozin Boyama.....	19
3.7 Krezil Viyole Boyama.....	20
3.8 İmmünohistokimyasal Boyama	20
3.9 Verilerin Eldesi ve İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1 Ağırlık ve Uzunluk.....	22
4.2 Hematoksilen- Eozin Boyaması.....	24
4.3 Krezil Viyole Boyaması.....	31
4.4 İmmunohistokimyasal Boyama	39
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
ÖZET	54
SUMMARY	56

7. KAYNAKLAR	58
--------------------	----



KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH:	Adrenokortikotropik Hormon
APAF-1:	Apoptozis Aktive Edici Faktör-1
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
CA:	Centella Asiatica
CAD:	Kaspaz Aktive Edici DNaz
CRH:	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
Fas-L:	Fas Reseptörünün Ligandı
GFAP:	Glial Fibril Asidik Protein
GMP:	Granulosit/ Monosit Progenitör
GR:	Glukokortikoid Reseptörü
HPA:	Hipotalamo-Pitüiter-Adrenokortikal
HSC-70:	Heat Shock Cognate-70
ICAD:	İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
KS:	Kortikosteroid
MR:	Mineralokortikoid Reseptörü
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
NBR-1:	Neighbor of BRCA1 Gene 1 Protein
PI3P:	Fosfatidil İnositol 3 Fosfat
PVN:	Paraventriküler Çekirdek
Sit-c:	Sitokrom C
SOR:	Serbest Oksijen Radikali
TNF:	Tümör Nekroz Faktör

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Fetus ve Fetus Beyninin Ölçümü	18
Resim 2: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının 3. Ventrikül Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları.....	25
Resim 3: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Lateral Ventrikül Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları	26
Resim 4: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Septum Pellucidum Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları	27
Resim 5: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Dentat Girus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları	28
Resim 6: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Talamus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları.....	29
Resim 7: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Koroid Pleksus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları	30
Resim 8: 3.Ventrikül Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları.....	33
Resim 9: Talamus Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları.....	35
Resim 10: Septum Pellucidum Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları	37
Resim 11: Nükleuslar Bölgesi Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları	38
Resim 12: Cas3 Boyamalarının Işık Mikroskop Görüntüleri (X40)	42
Resim 13: Lc3β Boyamalarının Işık Mikroskop Görüntüleri (X40)	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: Manuel Doku Takibi İşlemi.....	19
Tablo II: Hematoksilen - Eozin Boyama Protokolü	19
Tablo III: Krezil Viyole Boyama Protokolü.....	20
Tablo IV: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının	22
Tablo V: Kontrol ve Deney Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması.....	22
Tablo VI: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması.....	23
Tablo VII: Deney ve Tedavi Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması	23
Tablo VIII: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	31
Tablo IX: 3.Ventrikül Bölgesi, Kontrol ve Deney Grupları Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	32
Tablo X: 3.Ventrikül Bölgesi, Deney ve Tedavi Grupları Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	32
Tablo XI: Talamus Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	34
Tablo XII: Septum Pellucidum Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	36
Tablo XIII: Septum Pellucidum Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması	36
Tablo XIV: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması.....	39
Tablo XV: Kontrol ve Deney Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması....	39
Tablo XVI: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması..	40
Tablo XVII: Deney ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması ..	40
Tablo XVIII: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Lc3β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması.....	43
Tablo XIX: Kontrol ve Deney Gruplarının Lc3β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması ..	43
Tablo XX: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Lc3β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması...	44

Tablo XXI: Deney ve Tedavi Gruplarının Lc3 β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması ... 44



EKLER

EK 1 : Etik Kurul Kararı



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prenatal stres, gebelik süresince yavrunun maruz kaldığı stres faktörlerini tarifleyen, doğumdan sonra devam eden ve davranışsal düzeyde ortaya çıkan, nörogelişimsel değişikliklerle ilişkili bir olgudur. Bu bağlamda, çocuklukta ve yetişkinlikte karşılaşılan psikososyal problemlerin nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır ve bilişsel davranışlar, fiziksel ve duygusal problemlerle ilişkili bulunmuştur (1).

Anne ile fetus arasında doğrudan bir nöral devre olmadığı için, fetal transdüksiyon, maternal fizyolojik sinyal yoluyla, plasenta aracılığıyla gerçekleşir (2). Anne stresinin bebeğe geçişinin, büyük oranda, gebede artan stres hormonlarının, plasental yolla fetuse geçip, hipotalamo-pituiter-adrenokortikal (HPA) aksın aktivitesini artırarak beyin gelişimini etkilemesi yoluyla olduğu düşünülmektedir (3). Maternal stres, annenin kortizon seviyesini arttırmakta ve fetuse geçen kortizon, gelişimi bozan etkiler göstermektedir (4). Gebelik döneminde, deksametazon, anneden fetuse iletilebilmekte, fetal dolaşımı, kan basıncı dengesini ve HPA aksı bozmaktadır (5). Ayrıca, maternal artmış kortikosteroid seviyesinin, oksidatif stresi uyardığı ve bu yolla fetal gelişimi bozduğu da bilinmektedir (6). Depresyon, şizofreni, sentetik glikokortikoid kullanımı da, prenatal stres nedeni olarak değerlendirilmektedir (5). Deksametazon, tedavi yan etkisi olarak, anksiyete ve stresi tetiklemekte bu da maternal stres artışına neden olmaktadır (7). Gebelerde, gerekli durumlarda kortikosteroid kullanımı açısından, stres dozu belirlenmiş ve aşılmaması önerilmiştir (8). Çalışmamızda, gebe farelere sentetik kortizon (deksametazon) uygulaması yaparak, prenatal stresi ortamı oluşturulmaya çalışıldı. Bu ortam için literatüre uygun olarak, uygulama yolu olarak intraperitoneal enjeksiyon belirlendi ve doz olarak 1mg/kg/gün deksametazon şeklinde tercih edildi (7).

Apiaceae ailesinden olan *Centella Asiatica*, otsu ve çok yıllık bir bitkidir. Geleneksel Hint tıbbının, tarihi medikal metni olan “*Sushruta Samhita*” da yer almakta, Çin’de *Gotu Kola* adıyla anılmakta ve yaşamın mucizevi iksiri olarak nitelenmektedir. Asya, Pasifik bölgesi, Afrika ve Amerika kıtasının bazı bölgelerinde yetişmektedir. Geleneksel Asya tıbbında, yüzyıllar boyunca, özellikle dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (9,10). Günümüzde hem geleneksel tıbbın hem de modern tıbbın ilgi alanına girmektedir. Yara ve yanık tedavisinde, egzema gibi cilt hastalıklarında etkili olduğunu öne süren bilimsel

araştırmalar mevcuttur (11).

Bilimsel araştırmalar, Centella Asiatica'nın cilt hastalıkları dışında, özellikle santral sinir sisteminde de önemli etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan  alışmalarda, Centella Asiatica ekstraktının, oksidatif hasarı azaltıcı etkisinin güçlü olduğu ve bu yolla Alzheimer hastalığı, inme ve yaşlanmanın bilişsel fonksiyonlar üzerine olumsuz etkilerini yavaşlattığı  ne sürülmektedir (12,13). Ekstraktın, NRF2 gen ekspresyonunu, mitokondriyal gen ekspresyonunu ve enzim aktivitesini arttırdığı ve nöroprotektif bir madde olduğu düşünülmektedir (14,15). Centella Asiatica'nın nöroprotektif özelliğinin araştırıldığı çalışmalarda, amiloid beta toksisitesi, Parkinson Hastalığı, Huntington hastalığı, inme, ağır metal toksisitesi gibi durumlarda faydalı olabileceğine dair görüşler mevcuttur (12,13,16). Ayrıca, anksiyolitik, antikonvülzan, nörojenik etkilerinin de olduğu düşünülmektedir (14,17,18).

Çalışmamızda, gebe farelerde prenatal stresin ortamını oluşturmak için uygulanan intraperitoneal kortizonun meydana getirebileceği fetal beyin gelişim hasarında, oral Centella Asiatica uygulamasının etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Beyin Anatomisi ve Gelişimi

Anatomik olarak sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olarak iki bölüme ayrılır. Merkezi sinir sistemi anatomik ve fizyolojik devamlılık gösteren medulla spinalis (omurilik) ve ensefalon(beyin) denen iki bölümden oluşur (19).

Beyin, makroskopik olarak beyin yarım küreleri, beyin sapı ve beyincik olarak üç bölümde incelenir (20). Beyin sapı (trunkus ensefali), medulla oblongata (bulbus), pons ve mesencephalon denilen üç yapıdan oluşur. Ensefalon ise truncus ensefali ile serebrum ve serebellum yapılarını da içine alacak şekilde incelenir (21).

Prozenkefalon bölümü diensefalon ve telensefalon olmak üzere iki bölümde incelenir. Telensefalon, hemisferium serebelli tarafından oluşturulurken, diensefalon bunun derinindeki epitalamus, metatalamus, talamus, hipotalamus tarafından oluşturulur. Diensefalona ait bir yapı olan talamus, birçok çekirdekten oluşan, koku duyusu dışındaki sensorial impulsların tamamının, kortekse gitmeden önce sinaps yaptığı önemli bir noktadır (19).

Her iki tarafın hemisferleri fissura longitudinalis serebri denilen bir yarık ile birbirinden ayrılmıştır. Her iki hemisferin arasındaki bu yarığın alt kısmında ise iki hemisferi birbirine bağlayan en büyük komissural yol olan korpus kallosum yerleşmiştir. Korpus kallosum önden arkaya rostrum korpus kallosi, genu korporis kallosi, trunkus korporis kallosi ve splenium olmak üzere dört bölümde incelenir (19).

Lateral ventriküller, her bir hemisferin içinde bulunan ve üç uzantısı olan boşluklardır. Ventriküler sistemin en kranialde bulunan kısmıdır. Foramen interventikulareler aracılığı ile üçüncü ventiküle drene olurlar. Her iki tarafın lateral ventikülleri ortada septum pellucidum denilen bir bölme ile birbirinden ayrılmıştır. Septum pellucidum her iki yüzü ependimal hücre ile kaplı vertikal bir bölmedir. Yukarıda korpus kallosum aşağıda ise fornixe tutunur. Lamina septi pellucidi denilen iki yaprak şeklindedir. Limbik sistemden inen bilgilerin dağıtımında görevli bir merkezdir (21).

Limbik lob korpus kallosumu bir halka şeklinde çevreleyen singulat girus, hipokampal girus, fasciolar girus, subkallosal girus ve hipokampus formasyonundan oluşan bir yapıdır. Limbik sistem terimi ise emosyonel olayların ve davranışın düzenlenmesinde görevli yapıların tamamını ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Limbik lob, korpus amygdaloideum, area septales, hipotalamus, epitalamus, talamusun bazı çekirdekleri ve bu yapılar arasındaki bağlantıların tamamı ise limbik sistemi oluşturur (20).

Hipokampus formasyonu: hipokampus, dentat girus ve bu yapılara ait beyaz cevher toplulukları olan alveus ve fimbria hipokampiden oluşur. Hipokampus, lateral ventiküllerin kornu temporalesinin tabanında bulunur. İnsanda 4-5 cm uzunluğunda olan bu yapının koronal kesitinin bir deniz atına benzemesi sebebiyle isimlendirmesi bu şekilde yapılmıştır (19).

Merkezi sinir sistemi, intrauterin yaşamın üçüncü haftasında, kalınlaşmış nöral plak şeklinde gelişmeye başlar. Nöral plak, primitif çukurun önünde yer alır ve kenarlarının yukarıya doğru kabarmasıyla, nöral katlantılar oluşur. Nöral katlantılar da nöral tüpü şekillendirir. Nöral tüpün şekillenmesi, servikal bölgeden başlayarak, kaudal ve sefalik yönde ilerler (22-24).

Nöral tüpün, ön nöroporu kapanır ve nöral tüp kavitesinin rostral ucundan: ön beyin (prozensefalon), orta beyin (mezensefalon) ve arka beyin (rombensefalon) olmak üzere üç beyin vezikülü gelişir (25). Prozensefalondan, myelensefalon ve metensefalon; mezensefalondan mezensefalon; rhombensefalondan ise diensefalon ve telensefalon olmak üzere beş adet, ilkel beyin kesesi oluşur. Myelensefalon, medulla oblongatayı; metensefalon, pons ve serebellumu; mezensefalon, aquaduktus serebriyi oluşturacak genişlemeyi; diensefalon, üçüncü ventrikül ve talamusu; telensefalon da serebral hemisferleri oluşturur (24).

Telensefalik veziküller, gebeliğin 30-35. günlerinde foramen monro bölgesinde gelişir. Telensefalik vezikülleri çevreleyen ince duvar yapı, orta hatta bulunan lamina terminalis tarafından birbirine bağlanır ve sonrasında germinal tabakayı oluşturur. Telensefalik veziküller, rostrokaudal ve lateroventral yönlerde büyürken, lamina terminalis aynı hızda büyümeyi (22,23). İntrauterin 7.haftada, nöral proliferasyonun izlendiği ventrikül duvarlarına komşu subependimal alanlar, germinal matriks olarak tanımlanmaktadır. Ventriküler sistemin gelişimi sırasında, germinal matriks, ventrikül duvarları boyunca oluşur. İntrauterin 8. haftada

migrasyon (göç) gerçekleşir. Bu olay, subependimal alanlardaki nöronal hücrelerin, radyal glial lifleri takip ederek dış kesime göçüdür (22). Korteksin en derin tabakasını yani 6.tabakayı oluşturacak hücreler, kural olarak en önce göç ederken, yüzeyel tabakasını oluşturanlar ise en geç göç ederler. Akson ve dentritlerden oluşan moleküler tabaka (1.tabaka) ise bu durumun istisnasıdır ve kortekse en erken ulaşırlar (23).

Prozensefalon kesesinin yan duvarlarında, bilateral kıvrımlar olarak gelişen beyin hemisferleri, korteks, substantia medullaris, bazal nükleuslar ve lateral ventrikülleri içerir. Korpus kallosum, anterior komissür ve hipokampal komissür, sağ ve sol hemisferleri birbirine bağlar. İnsula ve beyin sapının arka kısmı üzerine uzanan, frontal, parietal, oksipital ve temporal loblar, hemisferlerin büyümesini takiben oluşurlar. Serebral korteks, manto tabakasından, marjinal tabakaya göçen prozensefalik nöroblastlar tarafından oluşturulur ve tüm kortikal tabakaların kökenini oluşturur (24).

Intrauterin 18. haftadan önce, primordiyal serebral hemisferler, fizyolojik lizensefali olarak tanımlanan düz bir yüzeye sahiptir. Serebral hemisferlerin ventrolateral yüzünde, Sylvian fissür, bu haftalarda görülmeye başlar. 6-7.aylarda Sylvian fissürü takiben, sırası ile rolandik, interparietal ve süperior temporal sulkuslar görülür. Sekizinci ayda, girus ve sulkusların oluşması ile lizensefali, yerini girensenfaliye bırakır ve beynin girintili çıkıntılı hali ortaya çıkar (22–24).

Lamina terminalisin dorsali, intrauterin 7. hafta dolaylarında, lamina reuniens adını alır. Bu bölgenin üst kısmında oluşan oluk, meninks primatava hücreleri ile dolar. Bu bölgeden korpus kallosum oluşur. Korpus kallosumun oluşumu, gelişimin 12-22. haftaları arasında gerçekleşir (24–27).

2.2 Beyin Histolojisi

Beyinde, gri madde korteksi, beyaz madde ise medullayı oluşturur. Serebral korteks, öncelikle sinapsların bulunduğu bölgedir. Bu bölgede, nöronların akson, dentrit ve gövdeleriyle birlikte, merkezi glial hücreler de bulunur. Serebrum ve serebelumun derin bölgelerindeki gri madde adacıkları ise nükleus olarak adlandırılır (26).

Memeli beyninde nöron sayısının yaklaşık on katı kadar glial hücre bulunur. Glial hücreler, nöronların etrafını sararak, nöronal aktivite için gerekli destek dokuyu oluşturur

(28). Glial hücreler, merkezi sinir sisteminde, astrosit, oligodendrosit, ependim hücreleri ve mikroglia olmak üzere farklı tiplerde bulunmaktadır (26).

Astrositler, isminden de anlaşılacağı üzere yıldız şeklindedir ve bu şekil hücrelerin uzantılarından oluşmaktadır. Glial hücrelerin, miktarca en fazla görüleni olan astrositler, nöronlara fiziksel ve metabolik destek sağlamanın yanında, nöronların kılcal damarlara ve pia matere bağlanmasında da önemli role sahiptir (28).

Astrositlere oranla daha az uzantısı olan, merkezi sinir sisteminde miyelin kılıf oluşmasından sorumlu hücreler, oligodendrositlerdir (28). Bu hücreler, plazma membranları aracılığıyla miyelin kılıf oluştururlar ve çoğunlukla aksonların arasında yerleşirler (26).

Ependim hücreleri, ventrikülleri ve omurilik kanalını döşeyen, bir tür prizmatik epitel hücreleridir (28). Ependim hücrelerinde, klasik epitelde bulunan lamina eksterna yapısı bulunmaz. Apikal yüzeyinde silya ve mikrovillus bulunan bu hücreler, beyin omurilik sıvısının (BOS) hareketini ve emilimini düzenlerler. Ayrıca, BOS sekresyonu ve kapiller dolaşımı düzenleme fonksiyonuna sahip koroid pleksus yapısı, ependim hücreleri ve ilişkili oldukları kapillerlerin özelleşmesiyle oluşmuştur (26).

Mikroglialar, kemik iliğindeki öncül hücrelerden köken alan, diğer glia hücrelerinin aksine, yoğun ve uzun şekilli çekirdeğe sahip, kısa uzantılı küçük hücrelerdir (28). Erişkin bir insanda, merkezi sinir sistemi (MSS) gliyal hücrelerinin ancak %5'i mikroglia hücrelerinden oluşur. Mononükleer fagositik sistemin üyesi kabul edilen mikroglia hücreleri, granülosit/monosit progenitör (GMP) hücrelerinden köken alırlar. İnflamasyon bölgesinde proliferasyon olarak fagositer fonksiyon üstlenirler (26). Temel görevleri, inflamasyon ve onarımdır. Fagositozun yanında, antijen sunma ve immunmodülasyon (sitokin salgısı) görevleri de vardır (28).

2.3 Farede Beyin ve Santral Sinir Sistemi Gelişimi

Omurgalılarda ortak olarak, merkezi sinir sistemi, nöral tüp adı verilen ektodermal dokudan gelişir (29). Farede, ektoderm üzerinde, embriyonel 7.günde, nöral plak adı verilen kabarıntı oluşur. Primitif çizginin görülmeye başlanması, çoğalan ve göç eden epiblast hücreleri tarafından, nöral plağın belirginleşmesiyle olur. Primitif çizgide oluşan primitif çukurdan sırasıyla notokordal uzantı ve notokordal kanal oluşur (29,30). Ektodermden

oluşan, nöral plak, nöral oluk ve nöral katlantıların birleşmesiyle nöral tüp oluşur. Nöral tüpü oluşturan bu süreç, norülasyon olarak adlandırılır (31). Farelerde, nöral tüpün oluşumu embriyonal 9-9,5 günlerde olur (29). Embriyonal 9. günde, ön ve arka nöroporun kapanması gerçekleşir ve üç ana beyin vezikülü (prozensefalon, mezensefalon ve rombensefalon), belirginleşir. 10,5-11. Embriyonal günde, ikincil beyin vezikülleri (ön beyin: telensefalon ve diensefalon, orta beyin: mezensefalon, arka beyin: metensefalon ve miyelensefalon) oluşur. 11. embriyonal günde, serebrokortikal nöronlar, hipokampus nöronları (CA1, CA3, dentat girus) oluşur. 12,5-13. embriyonal günlerde, koroid pleksus oluşumu gerçekleşir ve 13. embriyonal günde, serebrokortikal nöronlar oluşmaya başlar. 15-17. Günlerde, korteks gelişimi büyük oranda tamamlanmış olur, korpus kallosum, dentat girus görünür hale gelir (32).

Farenin gebelik süreci 19,5 gün sürmekte ve bu sürenin 18.gününde nöral tüpler kapanmaktadır. Bu gelişim süreci içerisinde, santral sinir sistemi ile ilgili çalışmaların, ilaç uygulamaları, genellikle 9-15. günlerde yapılmaktadır. Gebelik sonlandırma ise, beynin tüm alanlarının şekillenmiş olduğu ve gelişimini tamamladığı 18,5. günde yapılarak, gerekli incelemeler yapılmaktadır (32).

2.4 Prenatal Stres

Prenatal stres, gebelik süresince yavrunun maruz kaldığı stres faktörlerini tarifleyen, doğumdan sonra devam eden ve davranışsal düzeyde ortaya çıkan, nörogelişimsel değişikliklerle ilişkili bir olgudur. Bu bağlamda, çocuklukta ve yetişkinlikte karşılaşılan psikososyal problemlerin nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır ve bilişsel davranışlar, fiziksel ve duygusal problemlerle ilişkili bulunmuştur (1). Kasırga ve tropik fırtınaya anne karnında maruz kalan çocuklarda, otizm prevalansının arttığı (33), dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda doğum öncesi stresin etkisi (34), yetişkinlerde depresyon ve şizofreni insidansının, anne karnında depreme maruz kalma, savaş durumu, doğum öncesi babanın ölümü gibi stres faktörleriyle ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (35).

Anne ile fetus arasında doğrudan bir nöral devre olmadığı için, fetal transdüksiyon, maternal fizyolojik sinyal yoluyla, plasenta aracılığıyla gerçekleşir (2). Anne stresinin bebeğe geçişinin, büyük oranda, gebede artan stres hormonlarının plasental yolla fetuse geçip HPA aksın aktivitesini arttırarak, beyin gelişimini etkilemesi yoluyla olduğu düşünülmektedir (3).

Prenatal stresin yavrudaki etkilerini saptamak amacıyla, günümüze kadar yapılan çalışmalarda, gebe sıçanlara parlak ışık altında kısıtlama, koşullandırılmış sakınma, kuyruk süspansiyonu, kalabalık ortam, tekrarlayan elektrik uyarısı, gürültü, immobilizasyon testleri kullanılmıştır (36). Stres faktörünün türü, uygulandığı dönem, yoğunluğu, yavruların cinsiyeti gibi etkenlerin, stresten etkilenme düzeyini değiştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (37,38).

Stres etkenine karşı, homeostazisi sağlamak amacıyla, sempatik sinir sistemi, adrenal bezler, limbik sistem ve hipotalamusun paraventriküler çekirdeği (PVN) aktive olur (39). Strese yanıt temel olarak, HPA aksın düzenlenmesi yoluyla gerçekleşir (40). Kortikotropin salgılatıcı hormonun (CRH), hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinden hipofizin portal sistemine salınımı, bu yanıtla ilişkilidir. CRH, hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınmasına, ACTH'da adrenal bezlerin uyarılmasına ve glukokortikoid salınmasına yol açar (41). Kortizol de stres yanıtı olarak, adrenal salınmasını potansiyelize eder, kardiyovasküler tonusu artırır, büyümeyi ve inflamatuvar yanıtı baskılar (40).

Glukokortikoidler için, glukokortikoid reseptörleri (GR) yüksek afiniteli iken, mineralokortikoid reseptörleri (MR) ise düşük afinitelidir. GR, beynin birçok bölgesinde bulunur ve stres yanıtı olarak artan glukokortikoid yanıtının negatif feedback mekanizmasını oluşturur. Daha çok hipokampusta bulunan MR ise HPA aksının bazal aktivitesini dengeler (42).

Stres yanıtının düzenlenmesinde, sempatik sistem aktivasyonu da önemlidir. Strese cevaben katekolamin ve nörepinefrin salgısı artar. PVN'da CRH salınımı, nörepinefrin tarafından uyarılır. Katekolaminler ise hipokampusta bulunan MR düzeyini regüle ederek negatif feedback mekanizmasında görev alır (42).

Bu mekanizmalardan da anlaşılacağı üzere, glukokortikoidler, stres yanıtında önemli bir düzenleyici role sahiptir. Bu düzenleyici rol, nöronal gelişim süresince ekspresyona uğrayan glukokortikoid reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir (43).

Nörogenezin normal seyretmesi ve beynin gelişmesi için, memelilerin, gebelik boyunca endojen glukokortikoidlere ihtiyacı vardır (44). Glukokortikoidlerin MSS gelişiminde, akson ve dendritlerin yeniden yapılanmasında önemli işlevleri olduğu bilinmektedir (45) .

Nöronal hücre büyümesi, farklılaşması, iletişimde rol alırlar (44).

Glukokortikoidlerin fazlalığı ve eksikliğinin, santral sinir sistemi gelişiminde yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olduğu, insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (46).

Farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda, deksametazon ve betametazon formundaki sentetik glukokortikoidlerin, prenatal dönemde, nöronal hücre proliferasyonunu azalttığı, hipokampus dentat girus ve neokortekste nörojenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (37,38).

Gebelikte, kadınların kortizol seviyeleri doğal olarak yüksektir, fetal büyüme ve pulmoner gelişim için bu yüksek düzey gereklidir. Maternal kortizolün (kortikosteron) fazlası, fetoplasental yolda, inaktif forma (kortison) dönüştürülür. Böylelikle maternal yüksek kortizolün, yüksek dozda aktif formunun fetuse ulaşması engellenmiş olur (43,47).

Gebelikte kortikosteroid kullanımını gerektiren durumlar, kardiyometabolik ve nöroendokrin cevap değişikliklerine neden olabilmektedir (48). Erken doğum riski taşıyan gebeliklerin yönetiminde, antenatal steroid kullanımı, akciğer maturasyonunun sağlanması ve komplikasyonları önlenmesi açısından son derece önemlidir (49). İmmunsupresif tedavi alması gereken gebelerde, diğer ilaçların gebelikte ilişkili riskleri ya da fetal gelişim üzerine bilinmeyen etkileri nedeniyle, kortikosteroidler kullanılmaktadır. Gebelerde kabul edilen optimal doz 20 mg/gün'den azdır ancak daha yüksek doza ihtiyaç duyan hastalar için, kontrolsüz otoimmunitenin, anne ve fetus sağlığına zararı daha fazla olduğu düşünülerek, daha yüksek dozlara izin verilebilmektedir (50).

Antenatal glukokortikoid tedavisinin preterm bebeklerde respiratuvar distress sendromu ve interventriküler kanamayı azaltmadaki etkinliği, uzun süredir bilinmekle birlikte günümüzde MSS üzerine olumsuz etkilerinin ortaya konmuş olması nedeniyle, kullanım alanı risk durumuna göre değerlendirilmektedir (51,52).

2.5 Hücre Hasarı ve Hücre Ölümü

Hipoksi, fiziksel ve kimyasal ajanlar (travma, yanık, ilaçlar ve radyasyon), genetik etkenler, immün sistem reaksiyonları, mikroorganizmaların etkileri sonucu, hücre hasarı oluşur. Hücre hasarında, oksidatif fosforilasyon bozulur, ATP azalır, anaerobik glikolize bağlı hücre içi pH düşer, hücre içi Na^+ , Ca^{+2} artışı olur ve bu durum geri döndürülemezse ATPaz, fosfolipaz, proteaz, endonükleaz gibi enzimlerin aktiflenmesine ve hücrenin ölümüne yol açar (53).

Hücre hasarı geri döndürülemezse, mitokondriyal serbest oksijen radikalleri (SOR) artışı ve proteaz enzimlerinin aktivasyonu membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur ve hücre nekroza gider. Nekroz, morfolojik olarak, sıklıkla iskemik olaylarda görülen koagülasyon nekrozu, enzimatik doku sindirimi ile karakterize likefaksiyon nekrozu, granülomlarla karakterize kazeöz nekroz, lipaz etkisiyle ortaya çıkan yağ nekrozu ve ekstremitelerin beslenme bozukluklarında ortaya çıkan gangrenöz nekroz olmak üzere, beş alt tipte incelenir (53).

2.5.1 Apoptoz

Apoptoz, genel olarak, potansiyel zararlı ya da yararlığını yitirmiş hücrelerin, hücre yıkımında görevli enzimleri aktive ederek, ortadan kaldırılmalarını sağlayan, genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü yoludur. Fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki tipe ayrılır. Embriyogenez esnasında, gelişimsel involüsyona bağlı hücre ölümü, menstrüasyon, menopoz, kastrasyon gibi durumlarda gerçekleşen hormon bağımlı involüsyona bağlı hücre ölümü, hızlı çoğalan (labil) hücrelerin turnoverı sonrasında gerçekleşen hücre ölümü, akut inflamasyon reaksiyonunda görev alan hücrelerin turnoverı, otoreaktif T lenfosit hücrelerinin döngüsü esnasında ölümü gibi durumlar fizyolojik apoptoza örnektir. DNA hasarı, hatalı katlanmış protein birikimi, parankimal organların kanal obstruksiyonu durumlarında gerçekleşen hücre ölümleri ve virüslerle enfekte hücrelerde T lenfosit aracılı hücre ölümü gibi patolojik durumlarda görülen apoptoz ise patolojik apoptoz olarak tanımlanır (53).

Apoptoz intrinsek ve ekstrinsek yollarla gerçekleşebilir. Temel yolak mitokondriyal yolak olarak da bilinen intrinsek yolaktır. Ekstrinsek yolak, reseptör aracılı apoptoz olarak da tariflenir.

İntrensek yol: Mitokondriyal zarların geçirgenliğinin artmasıyla, mitokondriden sitokrom-c (sit-c) sitoplazmaya sızar, kaspaz proteinlerini aktive ederek apoptozu başlatır. Bu süreç, Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bcl-2 protein ailesinde proapoptotik ve antiapoptotik proteinler bulunmakta, bunların dengesi, hücrenin apoptoza gitmesinde etkili olmaktadır. Bad, Bax, Bid, Bcl-xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa proapoptotik proteinlerdir ve sitozolde bulunmaktadır. Antiapoptotik proteinler olarak bilinen Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1 ise çekirdek zarı, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunurlar. Sağlıklı hücrelerde, büyüme faktörü gibi uyarılar, antiapoptotik proteinlerin üretimini artırır. Büyüme faktörlerinden ve hücre için yaşamsal uyarıdan mahrum kaldığında, tolere edilemeyecek miktarda hatalı katlanmış protein birikimi olduğunda ya da DNA hasarı durumunda, proapoptotik BH-3 proteinleri (Bim, bid, bad) artar ve denge apoptoz lehine döner. Proapoptotik proteinler (bax, bak), dimerize olarak mitokondri membranına girer, sitokrom- c nin sitozole çıkışını sağlar. Sitozolda apoptozisi aktive eden, apoptozis aktive edici faktör (APAF-1) bulunmaktadır. Sitokrom-c APAF-1 ile sitozolde birleşerek Apoptozom adı verilen molekülü oluşturur. Bu molekül, kaspaz-9'un aktive edilmesini sağlar. Kaspaz-9 ise kaspaz-3'ün aktiflenmesini sağlar. Sürecin sonunda kaspaz aktive edici DNAaz (CAD) aktiflenir ve hücre çekirdeğinde kromatin kondansasyon ve fragmentasyonu gerçekleşir (53–55).

Ekstrensek yol: Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptör ailesinden olan, ölüm reseptörleri adıyla bilinen, Tip-1 TNF ve Fas (CD95) reseptörleri, birçok hücrede bulunur. Fas reseptörünün ligandı (FasL), aktive T lenfositlerde eksprese edilir. Fas reseptörü bulunan hücre, aktive T lenfositlerinde FasL tarafından tanındığında, Fas-FasL çapraz bağlanması gerçekleşir ve adaptör proteinlere bağlanır. Bu yolla kaspaz-8 aktive edilerek apoptoz, ekstrensek yoldan başlatılmış olur (53,54,56). Kaspaz-3'ün ekstrensek yolda kaspaz-8 tarafından aktive edilmesi doğrudan ya da Bid aracılığıyla dolaylı olarak gerçekleşir. Sonuçta aktiflenen kaspaz-3 her iki yolun sonunda da CAD aktivasyonu ve DNA fragmentasyonuna yol açar (53,54,57).

Apoptozisin düzenlenmesinde tümör süpressör gen olarak bilinen p53'ün de etkisi önemlidir. p53, DNA hasarı oluşan hücreyi, G1 fazında durdurur, tamiri mümkün olmayan hasar durumunda, Bcl-2 ve Bcl-x baskılanırken, Fas, Apaf-1 ve bax yapımı artırılarak hücre, apoptoza yönlendirilir (53,58).

Sistein proteaz ailesinden olan kaspazlar, işlevine göre, inflamatuvar, initiatör ve executioner olmak üzere üç grupta incelenir. Kaspazlardan 1,4,5,11,12,13 ve 14, inflamatuvar

olarak görev alırlar. İnitiatör ya da başlatıcı olarak sınıflandırılanlar ise 2,8,9 ve 10'dur. Executioner ya da efektör olarak sınıflandırılanlar, 3,6 ve 7'dir . Normalde inaktif halde bulunan kaspazlar, proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirirler. DNA tamir ve replikasyon yolundaki enzimleri inaktive ederek, hücre iskelet proteinlerini ve 100 civarında hedef proteini keserek, hücre zarının tomurcuklanmasına ve apoptoza neden olurlar (59).

2.5.2 Otofaji

Otofaji, aktivitesini yitirmiş proteinlerin ve organellerin, otofagozom içine alınarak, lizozomal enzimlerle sindirilmesidir. Hücresel fonksiyonların devamını sağlamak için, ortadan kaldırılması gereken protein ve organeller, otofagozoma alınır ve otofagozomların lizozoma bağlanmasıyla, sindirim gerçekleşir (60). Hasarlı proteinler, serbest oksijen radikalleri gibi hücresel fonksiyonların devamlılığı için tehdit oluşturan yapıların ortadan kaldırılması, otofajiyle gerçekleşir. Otofaji, katabolik bir süreç gibi görünmesine karşın, bütüncül değerlendirildiğinde, hücre bütünlüğünün sürmesi için, hem katabolik hem anabolik süreçlere katkı sunmaktadır (61).

Otofaji, makro, mikro ve şaperon aracılı otofaji şeklinde, üç farklı yolla gerçekleşebilir. Ortak olarak üç yolda da yıkıma uğrayacak hücre materyalleri, lizozomlarca yıkılır. Makrotofaji, ana otofajik yoldur. Protein fragmentlerinin ve hasar görmüş organellerin yıkımında önemlidir. Otofagozomlar, yıkıma uğrayacak materyalleri hapsedip lizozoma taşır ve lizozomal enzimlerle, protein, karbonhidrat, lipid, RNA gibi materyallerin ve mitokondri, peroksizom gibi organellerin yıkımını sağlarlar. Otofagozomu oluşturan, endoplazmik retikulumun, fosfatidil inozitol 3 fosfattan (PI3P) zengin membranlarıdır. Bu membranlar, biraraya gelir, uzanır, kapanır ve otofagozom oluşturulur. Lizozomla birleşmiş otofagozomlar, otolizozom olarak adlandırılır. Otolizozomların içeriğindeki asidik enzimler yıkımı gerçekleştirir. Mikrotofaji yolu ise, daha küçük sitoplazmik içeriklerin lizozomlarca pinositozuyla gerçekleşen bir yoldur. Bir diğer otofaji yolu olan şaperon aracılı otofaji, daha seçici bir yol olup, KFERQ motifli proteinleri tanır ve hedefler. Bu yolda, şaperon kompleksler vardır ve Heat Shock Cognate 70 (HSC70) içerirler. Bu şekilde tanıdıkları proteinlerin, lizozomal membrana ulaşmasını sağlarlar. Lizozomal membranda ise proteinler tanınarak sindirilmek üzere içeriye alınırlar (61–63).

Otofajide rol alan proteinler, mayalarla yapılan çalışmalar sonucu keşfedilmiştir. Sonrasında bu keşfedilen proteinlerin, ökaryot hücrelerde homologları tanımlanmış ve Atg proteinleri olarak bilinen, otofaji ile bağlantılı proteinler tanımlanmıştır (64). Otofaji sürecine katılan üç ana protein Beclin-1, Lc3 ve P62'dir (65).

Sitoplazmik yapılarda lokalize olan Beclin-1, otofaji sürecinin başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol alır. Ayrıca, endositozda, hücrelerin yaşlanma ve ölümü gibi süreçlerinde de yer almaktadır. Beclin-1, PI3P üretiminde yer alan fosforilasyon enziminin (sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz), temel bileşeni olarak bulunur (66,67).

İlk olarak maya hücrelerinde Atg8 olarak tanımlanmış olan Lc3 proteinini, çözünür protein yapısındadır ve NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein) ve p62 ile birlikte otofagozomda, organel ve protein taşınmasında rol almaktadır (68). Otofagozomun genişlemesi için Atg5-Atg12 ve Lc3 konjugasyon sistemine ihtiyaç vardır. Bu sistem, sitoplazmada Atg5-Atg12- Atg16L kompleksinin oluşması ve preotofagozomal zara bağlanmasıyla aktiflenir. Lc3, bu bağlanma sonrası bölgeye gelir (69). Lc3, Atg4 proteazı tarafından, serbest formu olan Lc3-I'e dönüştürülür. Lc3-I ise, Atg7 ile aktiflenir, Atg3 ile işlenir ve Lc3-II'ye dönüşür. Lc3-II, lipidlenmiş formdur ve Lc3'ün preotofagozomal membrana bağlanması için gereklidir (70,71).

Bir diğer otofaji proteini olan p62, proteinlerin parçalanması sürecinde reseptör fonksiyonuna sahiptir. Ubiquitinlenmiş proteinlerin, p62 aracılığıyla, proteozoma iletildiği gösterilmiştir (72). Bunun dışında, ubiquitinlenmiş proteinlere bağlanarak, çekirdek ve sitoplazma arasında mekik oluşturduğu da bilinmektedir (72). p62 proteini üzerinde, Lc3 ile etkileşimini sağlayan "Lc3 ile etkileşen bölge" anlamına gelen LIR ve C-terminal UBD dizileri bulunmaktadır (73). p62 proteini, otofajideki görevini, Lc3 ile olan ilişkisi yoluyla gerçekleştirir (74).

2.6 Centella Asiatica

Apiaceae ailesinden olan *Centella Asiatica*, otsu ve çok yıllık bir bitkidir. Geleneksel Hint tıbbının, tarihi medikal metni olan "Sushruta Samhita" da yer almakta, Çin'de Gotu Kola adıyla anılmakta ve yaşamın mucizevi iksiri olarak nitelenmektedir. Asya, Pasifik bölgesi, Afrika ve Amerika kıtasının bazı bölgelerinde yetişmektedir. Geleneksel Asya tıbbında, yüzyıllar boyunca, özellikle dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (9,10). Günümüzde hem geleneksel tıbbın hem de modern tıbbın ilgi alanına girmektedir. Yara

ve yanık tedavisinde, egzema gibi cilt hastalıklarında etkili olduğunu öne süren bilimsel araştırmalar mevcuttur (11). Cilt patolojileri dışında: antipiretik, diüretik, antiromatizmal, antibakteriyel, antiviral, antifungal ve hücre çoğalmasını uyarıcı etkilerinin olduğu öne sürülmektedir (11,75).

Centella Asiatica'nın farmakolojik etkinliği, zengin tripten içeriğinden kaynaklanmaktadır. Özellikle, "saponinler" olarak bilinen madekassoit ve asiaticosit, "sapogenin" olarak bilinen madekassik asit ve asiatic asit içermektedir (76). Bunların dışında, içeriğinde, kafeik asit türevleri, flavonoidler, kuersetin, kaemferol, kateşin, rutin, steroller, lipidler bulunmaktadır (76).

Hayvan çalışmalarında, Centella Asiatica'nın açık yaralara uygulanmasıyla, yara bölgesinde kollojen sentezinin ve glukozaminoglikan sentezinin uyarıldığı, anjiyogenezin arttığı, insan fibroblast hücrelerinde de fibronektin ve kollojen sentezinin uyarıldığı öne sürülmüştür (10,77). Centella Asiatica içeriğindeki asiaticosit bileşiğinin, SMAD yolağından bağımsız olarak TGF beta reseptör 1 aktivasyonu aracılığıyla kollojen tip 1 sentezini uyardığı, titre edilmiş formunun DNA bağlanma afinitesini düzenleyerek, melanogenezi inhibe ettiği, tirozinaz ve melanin içeriğini azalttığı bildirilmiştir (78–80). Ayrıca kollojen sentezini düzenleyen, hidroksiprolinden zengin peptid seviyelerini arttırarak, yara iyileşmesini ve epitelizasyon sürecini hızlandırdığı raporlanmıştır (81).

İnsan gönüllüler üzerinde, %5 Centella Asiatica ekstresi içeren krem formu kullanılarak yapılan çalışmada, cilt yüzey hidrasyonunun arttığı, transepidermal su kaybının azaldığı ve cilt neminin iyileştirilmesinin sağlandığı bildirilmiştir (82).

Centella Asiatica'nın antioksidan aktivite bakımından, askorbik asit, üzüm çekirdeği ekstraktı gibi antioksidanlarla kıyaslandığında, etkili bir antioksidan etkisinin olduğu belirtilmiştir (81).

Bilimsel araştırmalar, Centella Asiatica'nın cilt hastalıkları dışında, özellikle santral sinir sisteminde de önemli etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda, Centella Asiatica ekstraktının, oksidatif hasarı azaltıcı etkisinin güçlü olduğu ve bu yolla Alzheimer hastalığı, inme ve yaşlanmanın bilişsel fonksiyonlar üzerine olumsuz etkilerini yavaşlattığı öne sürülmektedir (12,13). Ekstraktın, NRF2 gen ekspresyonunu,

mitokondriyal gen ekspresyonunu ve enzim aktivitesini arttırdığı ve nöroprotektif bir madde olduğu düşünülmektedir (14,15). Centella Asiatica'nın nöroprotektif özelliğinin araştırıldığı çalışmalarda, amiloid beta toksisitesi, Parkinson Hastalığı, Huntington hastalığı, inme, ağır metal toksisitesi gibi durumlarda faydalı olabileceğine dair görüşler mevcuttur (12,13,16). Ayrıca, anksiyolitik, antikonvülzan, nörojenik etkilerinin de olduğu düşünülmektedir (14,17,18).

Centella Asiatica ekstraktının, GABA sentezinde anahtar enzim olan, glutamat dekarboksilaz enziminin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (83). İnhibitör nörotransmitter olan GABA üzerine bu etkilerin, anksiyolitik etkinliğin yanında, antikonvülzan etkiyi de destekleyebileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ile de nöbetleri engellediği, sıçan nöbet modeli yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (84).

Tabassum ve ark. tarafından kemirgen felç modellerinde yapılan çalışmada, Centella Asiatica'nın, enfarkt alanını küçülttüğü, orta serebral arter tıkanıklığına bağlı gelişen semptomları geriletmediği gösterilmiştir (85).

Centella Asiatica'nın bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisini araştıran çalışmalar, son yıllarda artmaktadır. Son on yılda yapılan çalışmalarda, Centella Asiatica ekstraktının, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını arttırdığı, yaşlı farelerde hafızayı güçlendirdiği gösterilmiştir (86). Hayvanların beyinlerinde, sinaptofizin ve post-sinaptik dansite proteini-95 (PSD95) artışı tespit edilmiştir (14).

Centella Asiatica'nın, amiloid beta toksisitesine bağlı hücre ölümlerini önlediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (12,87,88). Amiloid beta birikim modeli yapılan bir çalışmada, sekiz ay boyunca Centella Asiatica ile tedavi sonucu, hipokampusta lipid peroksidasyonunda ve DNA'nın oksidatif hasarında azalma izlenmiştir (89). Yine yaşlanma modeli bir çalışmada, Centella Asiatica tedavisiyle, lipid peroksidasyonunun azaldığı ve antioksidan enzim aktivitesinin restore edildiği bulunmuştur (86).

Gebe farelerle yapılan çalışmalarda, Centella Asiatica'nın, prenatal dönemde, santral sinir sistemi hasarına karşı, koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Prenatal dönemde etanole maruz bırakılan yavruların, hafıza, kaçınma gibi becerilerinin Centella Asiatica kullanımı ile daha fazla korunduğu gösterilmiştir. Tedavi edilen grupta, oksidatif stres

belirteçlerinin daha az olduğu, antioksidan enzim miktarının daha fazla olduğu ve hipokampus hasarının daha az olduğu gösterilmiştir (90). Prenatal dönemde, nöronal gelişimin incelendiği başka bir çalışmada, prenatal dönemde Centella Asiatica uygulanan yavruların santral sinir sistemlerinde, daha fazla dallanma sıklığına sahip, iyi gelişmiş akson ve dendritler ve daha geniş bir nöronal ađ izlenmiştir (91).

Çalışmamızda, Centella Asiatica'nın, nöroprotektif etkilerini, santral sinir sistemi gelişimi üzerine etkilerini ve prenatal strese karşı koruyucu etkilerini gözlemlemek amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 18.02.2021 tarih ve 64583101/2021/034 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

Çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen, yaklaşık 8-12 haftalık, ortalama 20-40 gram ağırlığında olan, öncesinde herhangi bir deneye dahil edilmemiş, 18 adet dişi ve 9 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanılmıştır.

Fareler, deney süresince, ısı: 21 ± 1 °C ve nem %45-65 oranında, ısı ve nem ayarı otomatik olarak ayarlanmış, 12:12 aydınlık/ karanlık aydınlatma planlı odalarda yaşatılmıştır. Fareler, polikarbon şeffaf kafeslerde, standart fare yemi ile beslenerek, bir haftalık sürede ortam koşullarına adapte edilmişlerdir.

Adaptasyon sürecinin ardından dişi ve erkek fareler, 2 dişiye 1 erkek fare olacak şekilde aynı kafese koyulup, gece boyu bırakılmış, devamında vajinal plak takibi ile gebelik kontrolü yapılmıştır.

3.2 Genel Planlama ve Ön Deney

Deney planlama öncesinde, kortizon uygulaması yapılan ve uygulama yapılmayan gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Hematoksilen eozin boyamasıyla yapılan karşılaştırmada, kortizon uygulanan gebe fare fetuslerinde, beyin ebatlarının daha küçük olduğu gözlemlenmiş ve bunun üzerine asıl deney bölümüne geçilmiştir.

3.3 Deney Gruplarının Planlanması

Deney için; kontrol grubu, deney grubu ve tedavi grubu olmak üzere üç grup belirlenmiştir:

1.Grup: Kontrol grubu, n=6

2.Grup: Peritoneal kortizon uygulaması yapılan grup, (deney grubu) n=6

3.Grup: Peritoneal kortizon uygulaması ve oral Centella Asiatica uygulaması yapılan grup (tedavi grubu) n=6.

Üç grup için 6'şar gebe fare alınıp, her kafeste 2 fare olacak şekilde deney sürdürülmüştür. Kontrol grubunda, gebeliğin 9-15 günleri arasında, toplam 5 gün, 1mg/kg/gün Serum Fizyolojik (SF), intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Diğer iki gruba, prenatal stres ortamı oluşturmak amacıyla, intraperitoneal olarak deksametazon uygulanmıştır (7). Deksametazon dozu, 1mg/kg/gün olarak belirlendi (7). Bununla birlikte 3.grupta deksametazon uygulamasına ek olarak, fare ağırlığına göre, her 1 kg için 1ml Centella Asiatica, oral gavaj yoluyla uygulanmıştır (10,92,93). Kullandığımız Centella Asiatica ekstraktının 1 mL'sinde 1000 mg saf Centella Asiatica bulunmaktadır. Dozumuz 1mL/kg/gün olarak ayarlanmıştır.

3.4 Deneyin Sonlandırılması

Gebeliğin 18.5 gününde, ketamin-ksilazin anestezisi altında perfüzyon işlemi uygulanmıştır. Bu yolla, embrioların fikse olması sağlanmış ve sonrasında sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır. Embrioların beyinleri diseke edilip %10'luk formalinle tespit edilmiştir.

Hassas terazi kullanılarak embrioların ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Boy ölçümleri de kağıt ve cetvel yardımıyla yapılmış, fotoğraflanarak kaydedilmiştir.



Resim 1: Fetus ve Fetus Beyninin Ölçümü

3.5 Işıık Mikroskobik İnceleme için Dokuların Takibi

Fetus beyinleri, formaldehitte tespit edilmiş, sonrasında 12 saat akar su altında bekletilmiş ve formalin solüsyonundan uzaklaştırılmıştır. Devamında doku takibi için sırasıyla tablo I’de görölen, doku takip basamakları uygulanmıştır.

Tablo I: Manuel Doku Takibi İşlemi

Uygulanan Kimyasal	Süre
%70’lik Alkol	1 Saat
%80’lik Alkol	1 Saat
%96’lık Alkol	1 Saat
%100’lük Alkol	1 Saat
Ksilol (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Ksilol (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Parafin (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Parafin (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Parafine Gömme	

3.6 Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin bloklardan, aynı laboratuvarında bulunan mikrotom cihazı ile 5µm lik seri kesitler alınıp numaralandırılmıştır. Seri kesitler incelenip, uygun seviyeler seçilerek boyama işlemi planlanmıştır. Hematoksilen- Eozin boyama protokolü, Tablo II’de göröldüğü şekliyle, uygulanmıştır.

Tablo II: Hematoksilen - Eozin Boyama Protokolü

Uygulanan Kimyasal	Süre
Ksilol	3 dakika
Ksilol	4 dakika
%100’lük Alkol	15-20 saniye
%80’lik Alkol	15-20 saniye
Distile Su	3,5 dakika
Hematoksilen	3 dakika
Akar su altında yıkama	1 dakika
Eozin	1 dakika
%80’lik Alkol	15-20 saniye
%100’lük Alkol	15-20 saniye
Ksilol	4 dakika
Ksilol	4 dakika
Entellan ile kapatma	

3.7 Krezil Viyole Boyama

Parafin bloklardan alınan kesitler Tablo III’de verilen basamaklar uygulanarak, Krezil Viyole ile boyanmıştır.

Tablo III: Krezil Viyole Boyama Protokolü

1	Alınan beyin kesitleri, bir gece 37°C’de etüvde tutuldu.
2	Etüv sıcaklığı, ertesi 16 saat sonra 60°C’ye çıkarılıp dokular 1 saat daha bekletildi.
3	Kesitler, ksilolde 30 dakika bekletilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.
4	Sırasıyla %100 ve %80’lik alkollerde 2’şer dakika bekletildi.
5	Kesitler distile suda 5 dakika bekletildi.
6	Krezil viyole boyası uygulanarak 5 ila 7 dk beklendi.
7	Akarsu altında 2dk yıkandı.
8	Sırasıyla %80 ve %100’lük alkollerde 2’şer dakika bekletildi
9	10 dakika ksilol içinde bekletilen dokular Entellan ile kapatılarak Işık Mikroskobunda

3.8 İmmünohistokimyasal Boyama

Fetuslerin beyinlerinden 5 µm kalınlığında alınan kesitlere, aşağıdaki sırayla , belirtilen işlemler uygulanarak immünohistokimyasal boyama yapılmıştır.

Öncelikle beyin kesitleri, polilizinli lama alınmış ve etüvde bir gece boyunca 37°C’de bekletilmiştir. Sonra, sırasıyla ksilol içerisinde ve ksilol dışında olmak üzere 60°C’lik etüvde 15’er dakika konularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesitler, şeffaflaştırma işleminden sonra, 2’şer dakika, sırasıyla, %100 etil alkol, %96 etil alkol, %80 etil alkol ve %70 etil alkol serilerinde bekletilmiştir. Distile suda 10 dakika bekletildikten sonra, etrafı kurulanmış ve PAP kalemiiyle çizilmiştir. Dokuların kurumasını önlemek için PBS solüsyonu damlatılmıştır. Bir sonraki basamakta, dokuların üzerine Tripsin-EDTA damlatılmış ve 20 dakika süreyle 37 °C’lik etüvde bekletilmiştir. 1:9 oranında, %30’luk hidrojen peroksit eklenmiştir (1ml H₂O₂+ 9 mL Metanol). PBS ile dokuları yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Solüsyon A (Blocking solüsyon) damlatılmış ve 1 saat beklenmiştir. Primer antikor Cas3 ve Lc3β (1:100 oranında dilüe), eklenmiş ve bir gece +4 °C’de bekletilmiştir. Dokular, tekrar PBS ile yıkanarak, Solüsyon B (Broad spectrum second Ab) eklenmiş ve 1 saat beklenmiştir. Önceden oda ısısına getirilip hazırlanan Solüsyon C (HRP – Streptavidin) damlatılmış, 30 dakika bekletilmiştir. PBS ile yıkanmıştır. 1 mL solüsyon E1 (DAB Substrat Buffer) içerisine, 1 damla solüsyon E2 (DAB chromogen) damlatılmış ve pipetaj yöntemiyle karıştırılıp vortekslenmiştir. Hazırlanan solüsyon, dokulara uygulanmış ve boyama gerçekleşene kadar

(ortalama 40 saniye) bekletilmiştir. Dokuların üzerine, Mayer's Modifiye Hematoksilen damlatılmış ve 30 saniye süresince bu şekilde bekletilmiştir. Ardından, akar su altında dokular 5 dakika süreyle tutulmuş. 2'şer dakika, %80'lik etil alkol ve %100'lük etil alkolde, sırasıyla bekletilmiştir. Son olarak 4 dakika süreyle ksilolde bekletilen dokular, entellan ile kapatılmış ve ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.9 Verilerin Eldesi ve İstatistiksel Analiz

Fetuslerin boyu, fetal beyinlerin en, boy ve ağırlıkları veri olarak işlenmiştir. Cas3 ve Lc3β boyanma özelliklerine göre; lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosum bölgeleri incelenerek, hiç boyanmamış olanlar negatif olarak değerlendirilmiş ve boyanma derecelerine göre, 0,1,2,3 diye numaralandırılmıştır. Krezil Viyole ile yapılan boyamada ise, X40 büyütmede, her anneden bir fetus seçilerek, 3.ventrikül, talamus, septum pellucidum ve nükleuslar bölgesi incelenerek nöron sayımı yapılmıştır.

Araştırma verileri SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 24.0 istatistik programına girilerek, analiz edilmiştir.

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan verilerde ortalama ve standart sapma değerleri, normal dağılıma uymayan verilerde ise ortanca, minimum ve maksimum verileri kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan verilerin karşılaştırılmasında ANOVA testi, normal dağılıma uymayan verilerin karşılaştırılmasında ise non-parametrik Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmesi için, p değerinin 0,05'ten küçük ($p < 0.05$) olması koşulu aranmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Ağırlık ve Uzunluk

Çalışmamızda, incelenen parametrelerden, fetus boyu (cm), fetal beyinlerin ağırlık (g), en (cm) ve boy (cm) değerlerinin Kolmogorov-Smirnov testiyle yapılan değerlendirmesinde normal dağılıma uymadığı tespit edilmiştir. Non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile yapılan değerlendirmede, kontrol, deney ve tedavi grupları arasında, fetus boyu (cm), fetus beyin ağırlığı (g), fetus beyin eni (cm) ve fetus beyin boyu (cm) açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p<0,001$) (Tablo IV).

Tablo IV: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Ağırlık ve Uzunluk Değerlerinin Karşılaştırılması

	P
Fetus Boy (cm)	<0,001
Fetus Beyin Ağırlık (g)	<0,001
Fetus Beyin En (cm)	<0,001
Fetus Beyin Boy (cm)	<0,001

Fetus boyu (cm), fetal beyinlerin ağırlık (g), en (cm) ve boy (cm) değerleri, gruplar arasında ikili olarak Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Tablo V’te kontrol grubu ile deney grubu arasındaki karşılaştırma verilmiştir. Buna göre, fetus boyunun ve fetal beyin boy, en ve ağırlık değerlerinin, kontrol grubunda, deney grubuna göre daha büyük olduğu görülmüştür. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Tablo V: Kontrol ve Deney Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu		Deney Grubu		p
	ortalama $\pm$SS	medyan (min-maks)	ortalama $\pm$SS	medyan (min-maks)	
Fetus Boy (cm)	2,32 $\pm$ 0,16	2,30 (2,0-2,70)	2,11 $\pm$ 0,14	2,0 (2,0-2,50)	<0,001
Fetus Beyin Ağırlık (g)	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 (0,07-0,12)	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 (0,04-0,08)	<0,001
Fetus Beyin En (cm)	0,59 $\pm$ 0,08	0,60 (0,50-0,80)	0,50 $\pm$ 0,05	0,50 (0,40-0,60)	<0,001
Fetus Beyin Boy (cm)	0,79 $\pm$ 0,08	0,80 (0,70-1,0)	0,68 $\pm$ 0,08	0,70 (0,60-0,80)	<0,001

Kontrol grubu ile tedavi grubu arasındaki karşılaştırmada, fetus boyunun, kontrol grubunda, tedavi grubuna göre daha büyük olduğu görülmüştür. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,01$). Fetus beyin ağırlığı, eni ve boyu açısından, kontrol ve tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Karşılaştırma Tablo VI'da verilmiştir.

Tablo VI: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Fetus Boy (cm)	2,32 $\pm$ 0,16	2,30 (2,0-2,70)	2,19 $\pm$ 0,14	2,20 (2,0-2,50)	<0,001
Fetus Beyin Ağırlık (g)	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 (0,07-0,12)	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 (0,06-0,10)	0,195
Fetus Beyin En (cm)	0,59 $\pm$ 0,08	0,60 (0,50-0,80)	0,55 $\pm$ 0,05	0,60 (0,50-0,70)	0,085
Fetus Beyin Boy (cm)	0,79 $\pm$ 0,08	0,80 (0,70-1,0)	0,80 $\pm$ 0,10	0,80 (0,60-1,0)	0,496

Deney grubu ile tedavi grubu arasındaki fetus boyu, fetal beyinlerin ağırlık, en ve boy değerlerinin karşılaştırılmasında, fetus boyunun ve fetal beyin boy, en ağırlık değerlerinin, tedavi grubunda, deney grubuna göre daha büyük olduğu saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Karşılaştırma, Tablo VII'de verilmiştir.

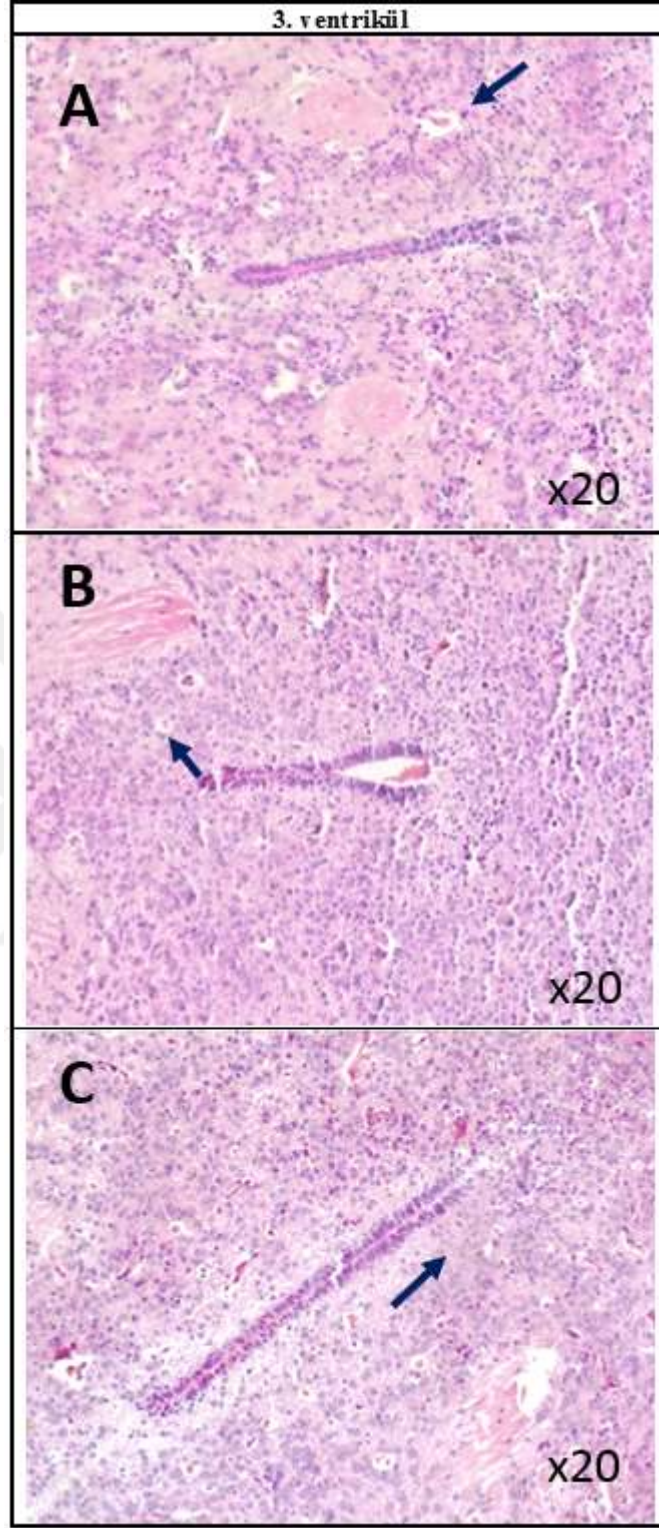
Tablo VII: Deney ve Tedavi Gruplarının Ölçüm Parametrelerinin Karşılaştırılması

	Deney Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Fetus Boy (cm)	2,11 $\pm$ 0,14	2,0 (2,0-2,50)	2,19 $\pm$ 0,14	2,20 (2,0-2,50)	=0,04
Fetus Beyin Ağırlık (g)	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 (0,04-0,08)	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 (0,06-0,10)	<0,001
Fetus Beyin En (cm)	0,50 $\pm$ 0,05	0,50 (0,40-0,60)	0,55 $\pm$ 0,05	0,60 (0,50-0,70)	=0,003
Fetus Beyin Boy (cm)	0,68 $\pm$ 0,08	0,70 (0,60-0,80)	0,80 $\pm$ 0,10	0,80 (0,60-1,0)	<0,001

4.2 Hematoksilen- Eozin Boyaması

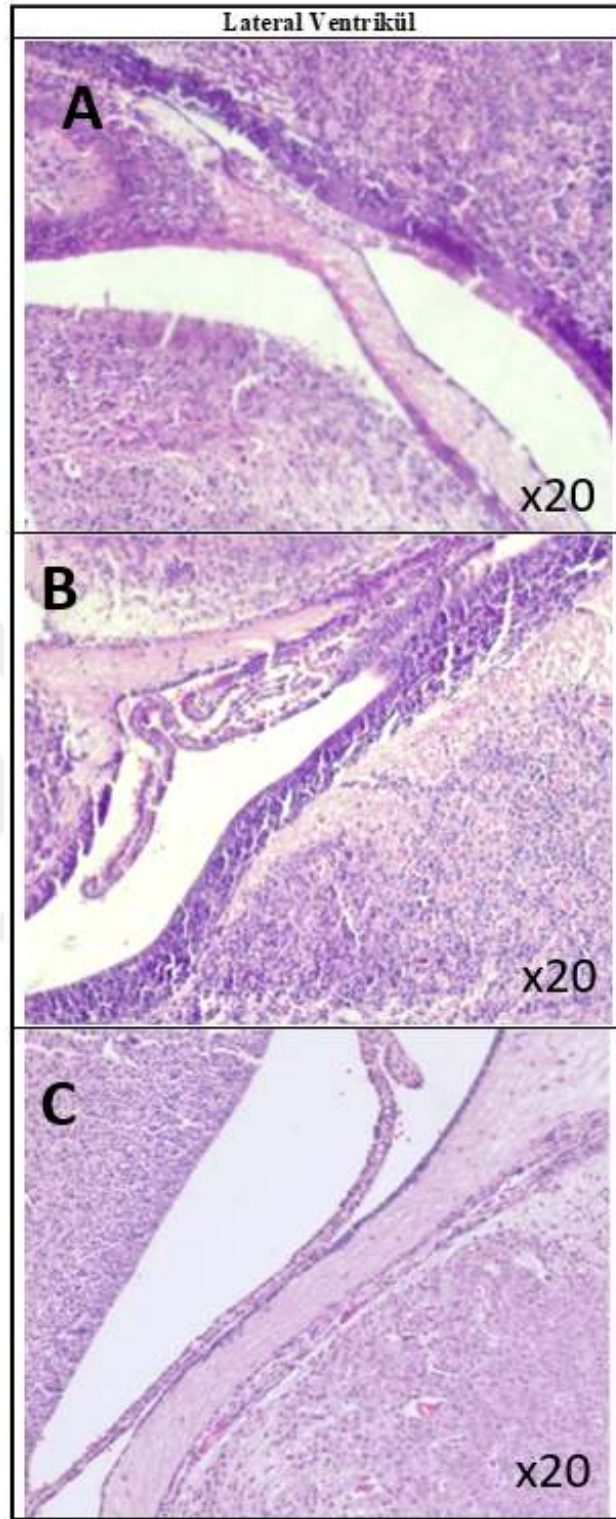
Her gruptan 6 fare ve her fareden 1 fetus olarak yaptığımız hematoksilen eozin boyama sonrası, her gruptan 6'şar preparatta 12'şer doku gözlemsel olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu, değerlendirilen tüm dokularda, deney grubunda, Dentat Girus Hippokampus alan büyüklüğünün, kontrol ve tedavi gruplarına oranla küçük olduğu izlenmiştir. Ayrıca, 3. Ventrikül çevresinin değerlendirilmesinde, nöron yoğunlaşması olduğu ve nöron boyutlarının küçük olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Resim 2,3,4,5,6 ve 7'de hematoksilen eozin boyama preparatlarının görüntüleri verilmiştir.





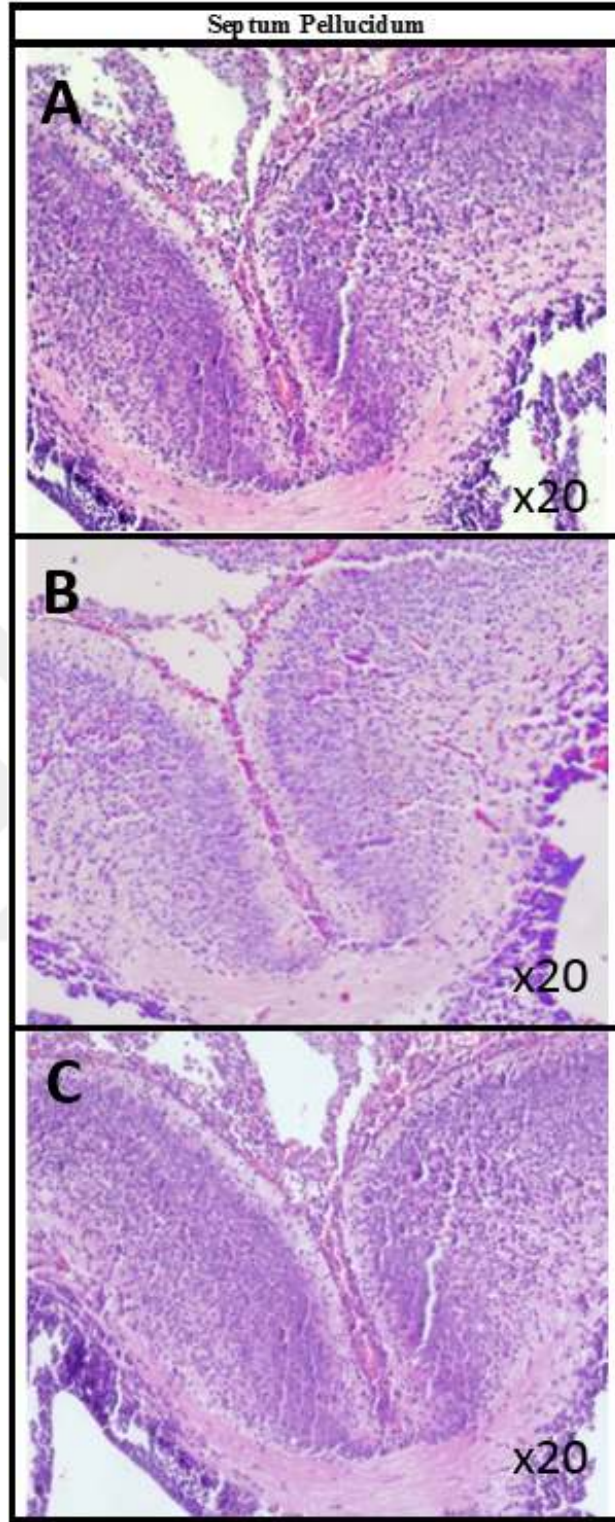
Resim 2: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının 3. Ventrikül Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, 3.ventrikül çevresinde, deney grubunda, artmış nöron yoğunluğu ve nöron boyutlarının gözlemsel olarak kontrol ve tedavi gruplarına göre daha küçük olduğu görülmektedir. Oklar nöronlara işaret etmektedir.



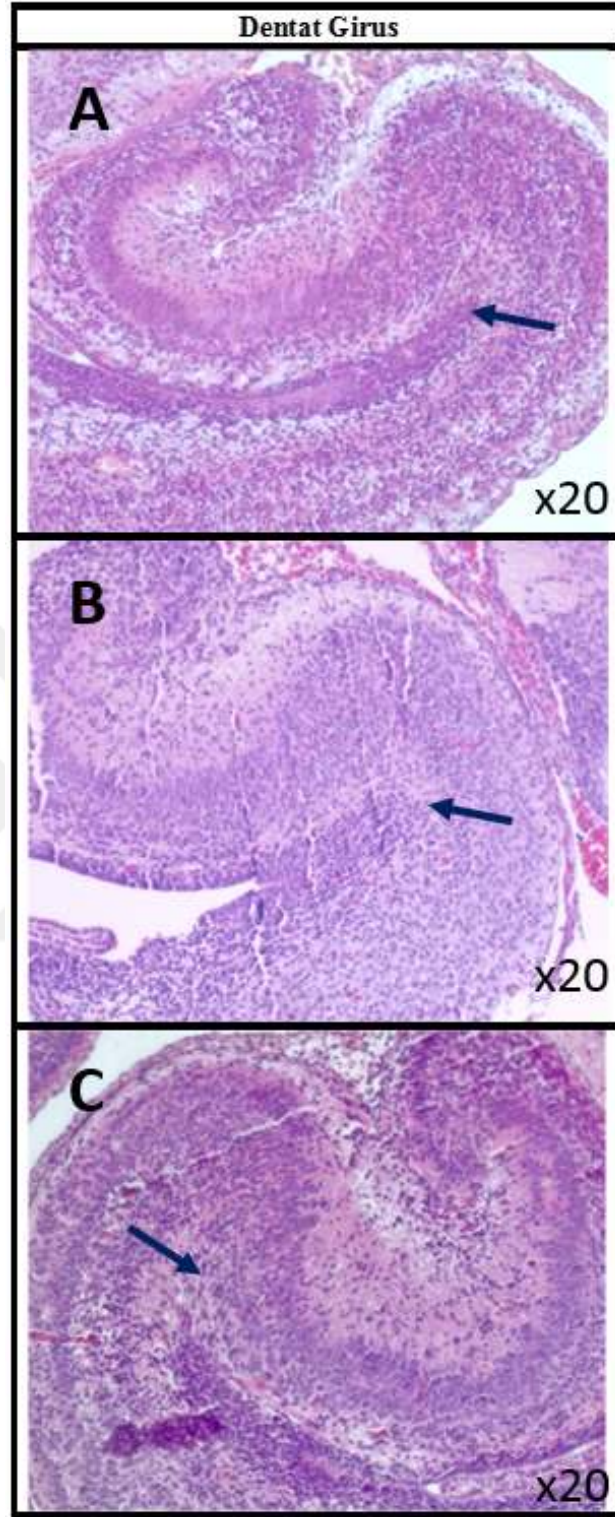
Resim 3: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Lateral Ventrikül Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, Lateral Ventrikül değerlendirmesinde gruplar arasında belirgin fark görülmemiştir.



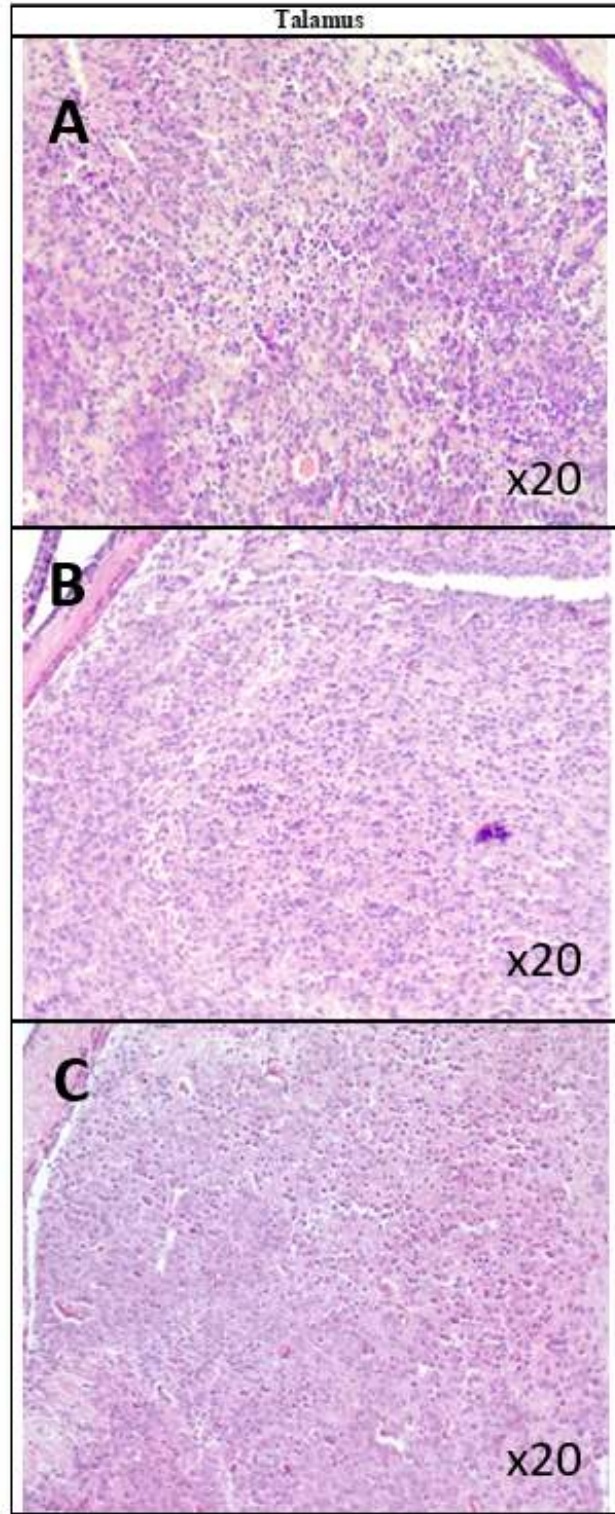
Resim 4: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Septum Pellucidum Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, Septum Pellucidum değerlendirmesinde gruplar arasında belirgin fark görülmemiştir.



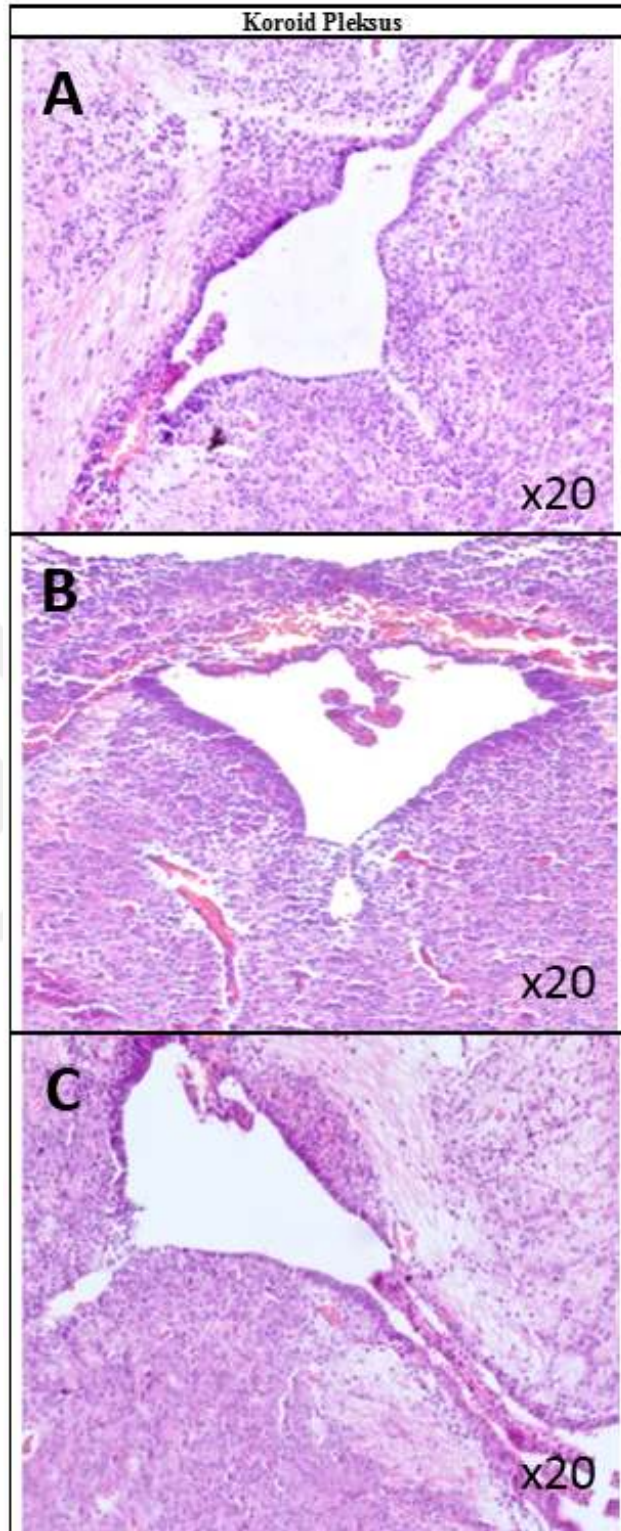
Resim 5: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Dentat Girus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, Hipokampus Dentat Girus bölgesinde, deney grubunda gelişimin tamamlanmadığı ve Dentat Girus boyutlarının, kontrol ve tedavi gruplarına göre daha küçük olduğu görülmüştür. Oklar, Dentat Girus kısımlarına işaret etmektedir.



Resim 6: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Talamus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, Talamus değerlendirmesinde, gruplar arasında belirgin fark gözlemlenmemiştir.



Resim 7: Kontrol Deney ve Tedavi Gruplarının Koroid Pleksus Hematoksilen-Eozinle Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X20 büyütmede, Koroid Pleksus değerlendirmesinde, gruplar arasında belirgin fark gözlemlenmemiştir.

4.3 Krezil Viyole Boyaması

Krezil viyole ile nöron sayımı yapmak için, her gruptan 6 gebe fare ve bunların 6'şar fetusları, 4 ayrı alan için sayılarak değerlendirilmiş ve krezil viyole boyama sonrası semikantitatif olarak nöron sayımı yapılmıştır. Bu değerlendirmede, seçilen alanlara bağlı olarak değişim gösteren, gruplar arası anlamlı farklılara sahip nöron sayıları gözlemlenmiştir. 3.ventrikül, Talamus ve Septum Pellucidum'da deney grubunda nöron sayısı anlamlı olarak yüksek bulunurken, nöronların subjektif olarak boyutlarının küçük olduğu gözlemlenmiştir (Resim 8,9,10). Bu sayımların istatistiksel değerlendirmeleri de yapılmıştır.

Krezil Viyole boyama ile hazırlanan preparatlardaki nöron sayılarının, normal dağılıma uyduğu tespit edilmiş, ANOVA testi ile gruplar arası fark değerlendirilmiştir. Buna göre, 3.ventrikül ($p<0,001$), talamus ($p<0,01$) ve septum pellucidum ($p<0,01$) bölgelerinde, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken, nükleuslar bölgesinde anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,227$) (Tablo VIII). Daha sonra Posthoc testi ile hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğuna bakılmıştır.

Tablo VIII: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Bölge	Grup	ortalama $\pm$ ss	P
3.ventrikül	kontrol	572,67 $\pm$ 62,60	<0,001
	deney	815,00 $\pm$ 84,18	
	tedavi	504,00 $\pm$ 60,18	
Talamus	kontrol	640,00 $\pm$ 54,03	=0,004
	deney	716,67 $\pm$ 61,21	
	tedavi	566,67 $\pm$ 74,47	
septum pellucidum	kontrol	510,33 $\pm$ 42,15	=0,001
	deney	648,00 $\pm$ 65,20	
	tedavi	503,33 $\pm$ 69,76	
Nükleuslar bölgesi	kontrol	439,33 $\pm$ 67,71	=0,227
	deney	458,33 $\pm$ 114,9	
	tedavi	528,33 $\pm$ 79,46	

3. ventrikül bölgesinin krezil viyole ile yapılan boyamasında, nöron sayıları arasında farklar Tablo IX ve Tablo X'da incelenmiştir. Buna göre deney grubunda nöron sayısı ($815,00 \pm 84,18$), kontrol grubuna ($572,67 \pm 62,60$) göre daha fazla izlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Deney grubunda nöron sayısı ($815,00 \pm 84,18$), tedavi grubuna ($504,00 \pm 60,18$) göre de fazla izlenmiş, bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Ayrıca, gözlemsel olarak, deney grubunda, nöron boyutları küçüktür (Resim 8). 3.ventrikülde, kontrol ve tedavi grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p = 0,236$).

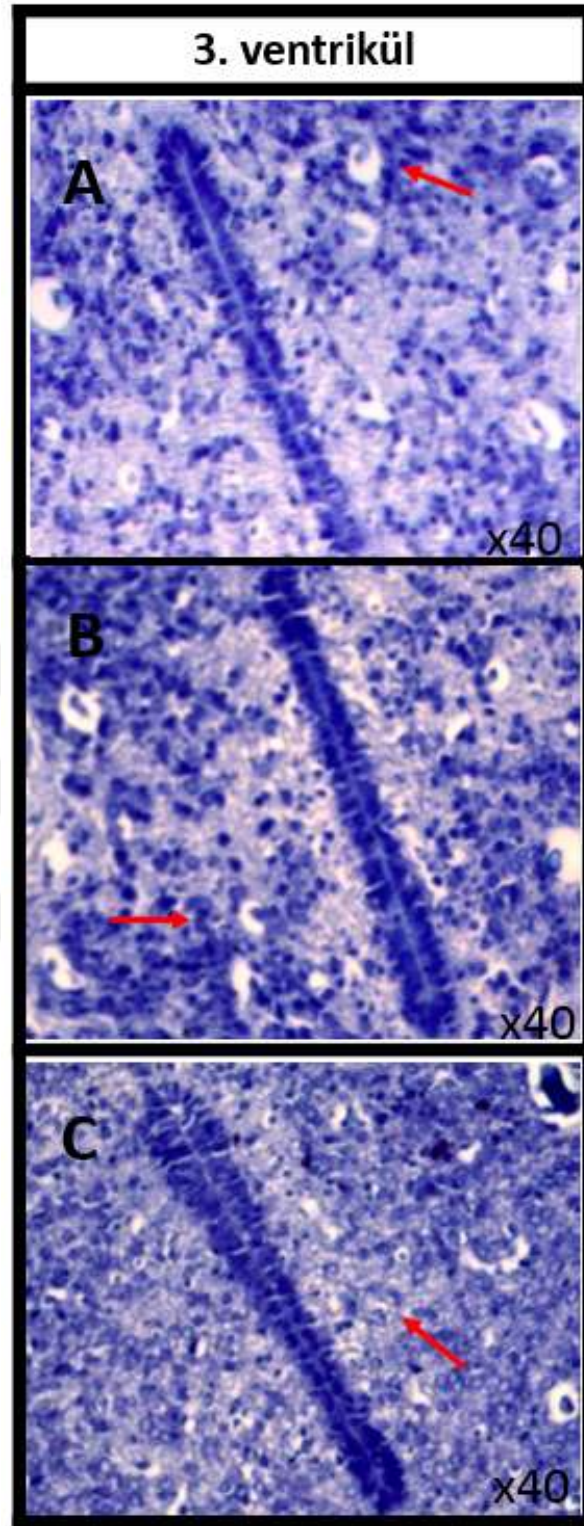
Tablo IX: 3.Ventrikül Bölgesi, Kontrol ve Deney Grupları Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Grup	ortalama $\pm$ ss	p
Kontrol Grubu	$572,67 \pm 62,60$	<0,001
Deney Grubu	$815,00 \pm 84,18$	

Tablo X: 3.Ventrikül Bölgesi, Deney ve Tedavi Grupları Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Grup	ortalama $\pm$ ss	p
Deney Grubu	$815,00 \pm 84,18$	<0,001
Tedavi Grubu	$504,00 \pm 60,18$	

Resim 8'de, 3.ventrikül bölgesinin krezil viyole ile boyanmış preparatları gösterilmiştir.



Resim 8: 3.Ventrikül Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları

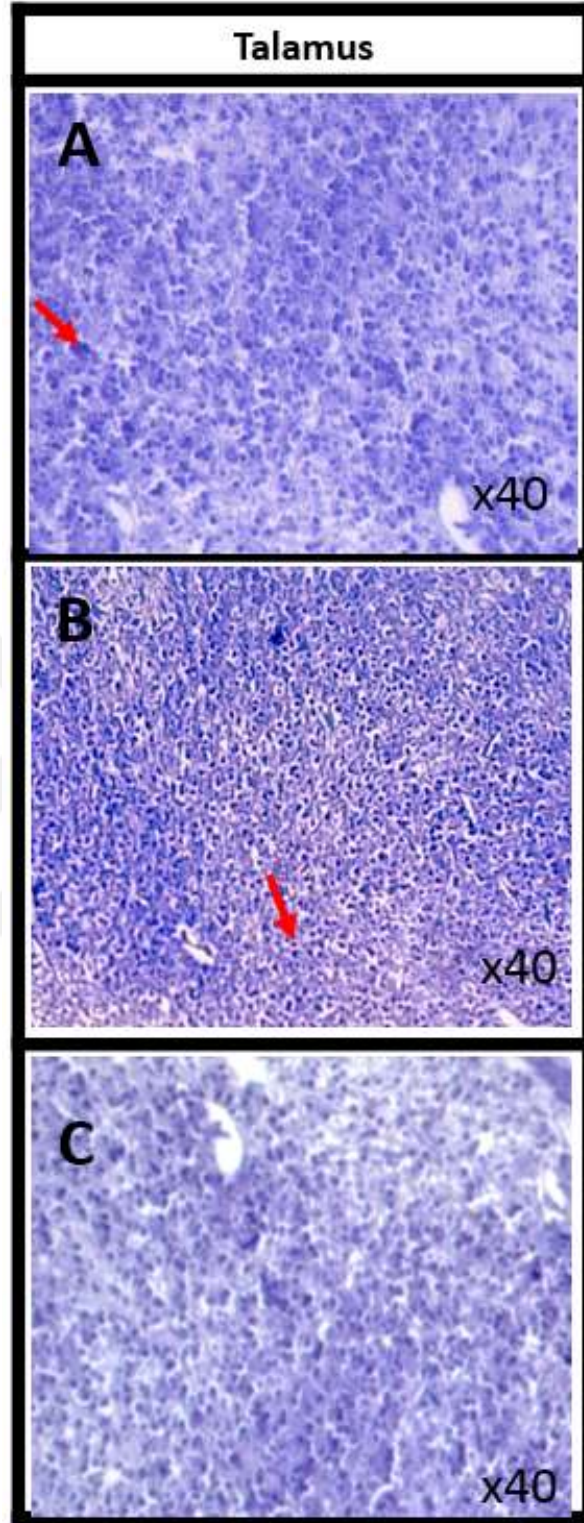
(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X40 büyütmede, 3.Ventrikül ve çevresinde, deney grubunda nöron sayısında artış ve nöron boyutlarında azalma görülmüştür. Oklar, nöronlara işaret etmektedir.

Talamus bölgesinin krezil viyole ile yapılan boyamasında, nöron sayıları arasında farklar incelendiğinde, deney grubunda nöron sayısının ($716,67 \pm 61,21$), tedavi grubuna ($566,67 \pm 74,47$) göre daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,01$). Tablo XI’de deney grubu ve tedavi grubunun karşılaştırılması verilmiştir. Talamus bölgesi için, kontrol grubu-deney grubu ($p = 0,128$) ve kontrol grubu-tedavi grubu ($p = 0,149$) karşılaştırmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

Tablo XI: Talamus Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Grup	ortalama $\pm$ ss	p
Deney Grubu	$716,67 \pm 61,21$	$=0,003$
Tedavi Grubu	$566,67 \pm 74,47$	

Talamus bölgesinin, kontrol, deney ve tedavi gruplarının, krezil viyole ile boyanmış preparatları, Resim 9’da verilmiştir.



Resim 9: Talamus Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X40 büyütmede incelenen Talamus'ta, deney grubunda, nöron sayısının fazla, nöron boyutlarının daha küçük olduğu görülmüştür. (Kontrol grubunda büyük nöron, deney grubunda küçük nöron kırmızı okla gösterilmiştir)

Septum pellucidum bölgesinde kontrol ve deney gruplarının nöron sayılarının karşılaştırılması Tablo XII’de verilmiştir. Buna göre, deney grubunda ($648,00 \pm 65,20$), kontrol grubuna ($510,33 \pm 42,15$) göre nöron sayısı daha fazla bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$).

Tablo XII: Septum Pellucidum Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Grup	ortalama $\pm$ ss	p
Kontrol Grubu	$510,33 \pm 42,15$	=0,003
Deney Grubu	$648,00 \pm 65,20$	

Septum pellucidum bölgesinde, nöron sayıları açısından, tedavi ve deney grubu arasındaki karşılaştırma, Tablo XIII’te verilmiştir. Buna göre, deney grubunda ($648,00 \pm 65,20$), tedavi grubuna göre ($503,33 \pm 69,76$) nöron sayısı daha fazla bulunmuştur. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$).

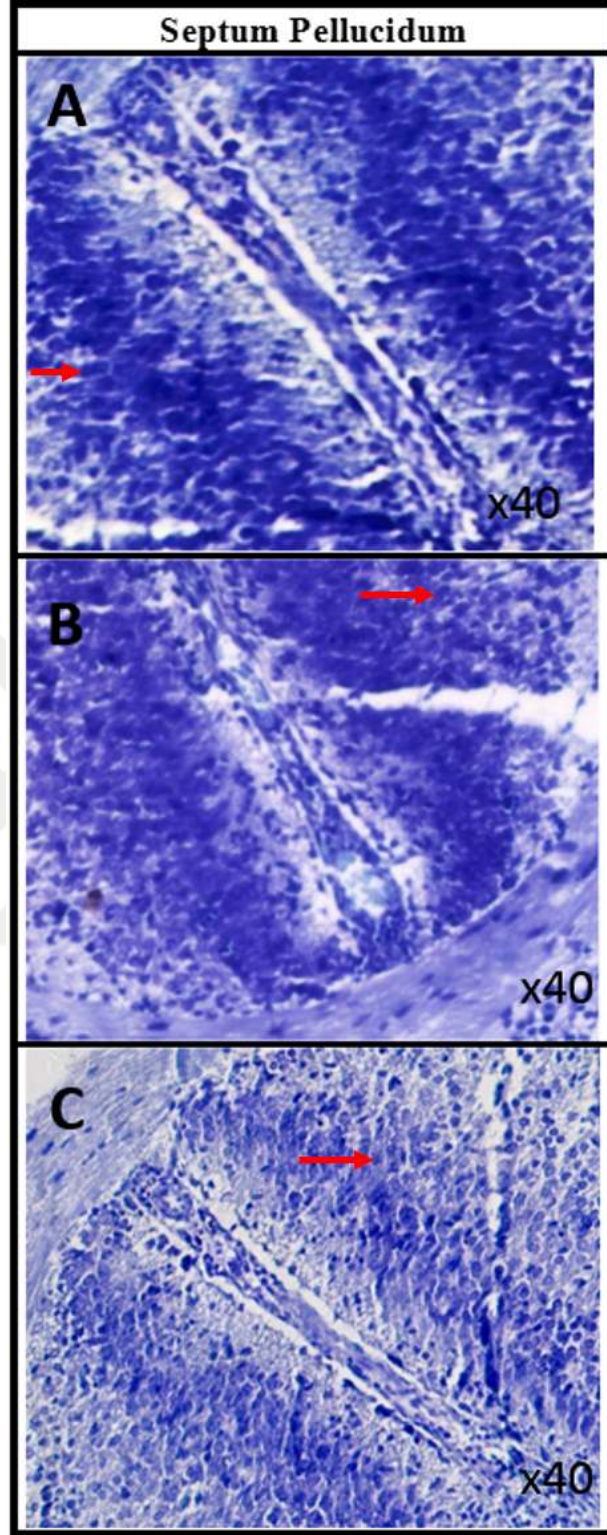
Tablo XIII: Septum Pellucidum Bölgesi Nöron Sayılarının Karşılaştırılması

Grup	ortalama $\pm$ ss	P
Tedavi Grubu	$503,33 \pm 69,76$	=0,002
Deney Grubu	$648,00 \pm 65,20$	

Septum pellucidum bölgesinde, kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($=0,978$).

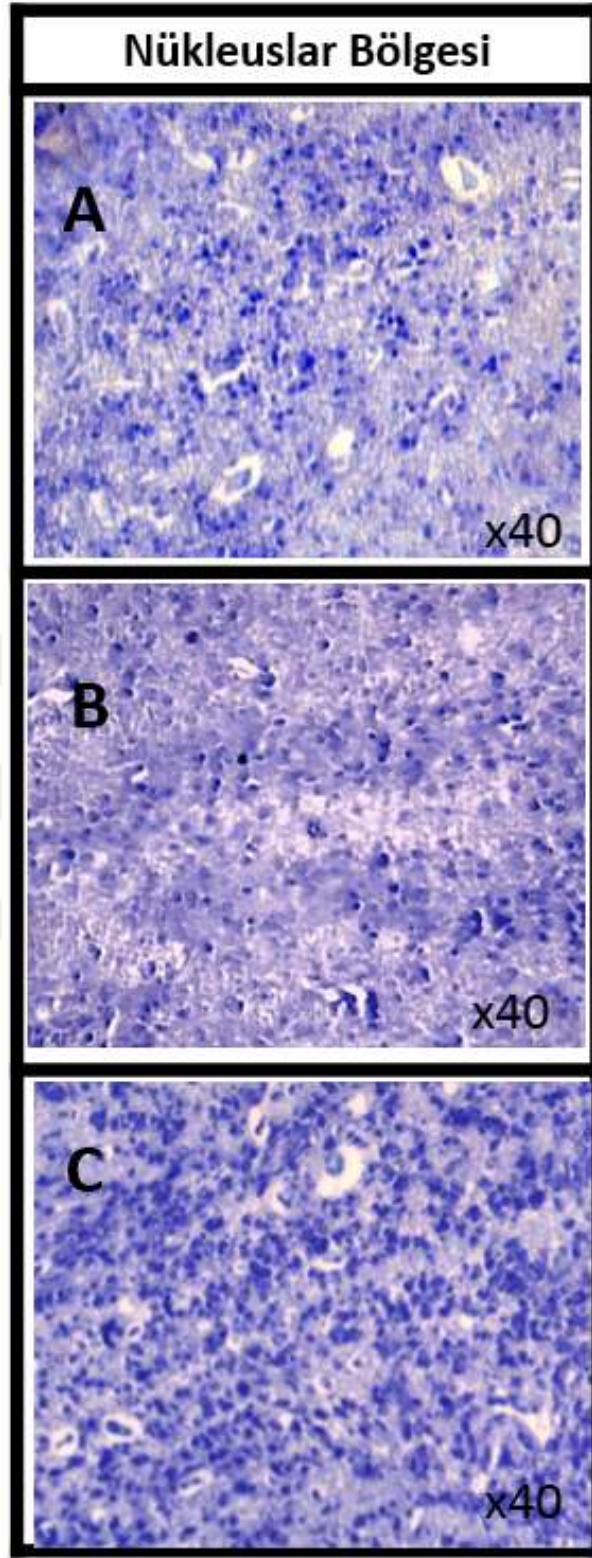
Resim 10’da, septum pellucidum bölgesinin, kontrol, deney ve tedavi gruplarının, krezil viyole ile boyanmış preparatları verilmiştir.

Nükleuslar bölgesinde, kontrol, deney ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. Resim 11’de nükleuslar bölgesinin kontrol, deney ve tedavi gruplarının krezil viyole ile boyanmış preparatları verilmiştir.



Resim 10: Septum Pellucidum Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X40 büyütme ile yapılan incelemede, Septum Pellucidum'da, nöron sayılarının kontrol ve tedavi, grubuna göre artmış olduğu, deney grubunda nöron boyutlarının daha küçük olduğu görülmüştür. Oklar, nöronları göstermektedir.



Resim 11: Nükleuslar Bölgesi Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Krezil Viyole ile Boyanmış Preparatları

(A: Kontrol Grubu, B: Deney Grubu, C: Tedavi Grubu) X40 büyütme ile yapılan incelemede, 3.Ventrikülün gerisinde kalan nükleuslar bölgesinde, nöron sayıları açısından gruplar benzer bulunmuştur.

4.4 İmmunohistokimyasal Boyama

Çalışmamızda, Cas3 ve Lc3β boyanma özelliklerinin verilerinin, normal dağılıma uymadığı saptanmıştır. Non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile gruplar arasındaki farklar değerlendirilmiş, istatistiksel olarak anlamlı fark olan gruplar Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

Kontrol, deney ve tedavi gruplarının Cas3 boyanma özellikleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Tablo XIV'te verilmiştir.

Tablo XIV: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	P
Lateral Ventrikül	=0,012
Koroid Pleksus	=0,001
Talamus	=0,006
Septum Pellucidum	=0,001
Dentat Girus	=0,019
Korpus Kallosum	=0,015

Cas3 boyanma özelliklerine göre, kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosum bölgelerinin hepsinde, deney grubunun kontrol grubuna göre daha fazla boyandığı gözlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Karşılaştırma ile ilgili detaylar Tablo XV'te verilmiştir.

Tablo XV: Kontrol ve Deney Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	Kontrol Grubu		Deney Grubu		P
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	=0,011
Koroid Pleksus	0 $\pm$ 0	0 (0-0)	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	=0,002
Talamus	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	2,33 $\pm$ 0,816	2,5 (1-3)	=0,005
Septum Pellucidum	0 $\pm$ 0	0 (0-0)	1,33 $\pm$ 0,516	1 (1-2)	=0,002
Dentat Girus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	1,83 $\pm$ 0,753	2 (1-3)	=0,011
Korpus Kallosum	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	1,50 $\pm$ 0,548	1,5 (1-2)	=0,030

Cas3 boyanma özelliklerine göre, kontrol ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında, yalnızca koroid pleksus bölgesinde, tedavi grubunun kontrol grubundan daha fazla boyandığı gözlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Diğer bölgelerde kontrol ve tedavi grubu arasında fark gözlenmemiş olup detaylar Tablo XVI'da verilmiştir.

Tablo XVI: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	Kontrol Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,575
Koroid Pleksus	0 $\pm$ 0	0 (0-0)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,019
Talamus	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	0,67 $\pm$ 0,816	0,5 (0-2)	=0,465
Septum Pellucidum	0 $\pm$ 0	0 (0-0)	0,17 $\pm$ 0,408	0 (0-1)	=0,317
Dentat Girus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	1,0 $\pm$ 0,632	1 (0-2)	=0,171
Korpus Kallosum	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	=0,269

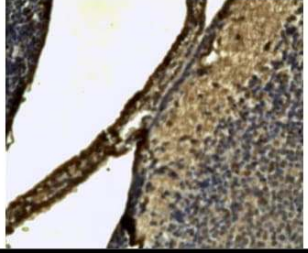
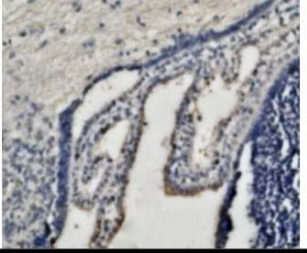
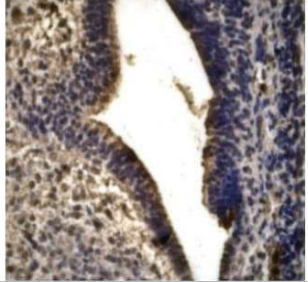
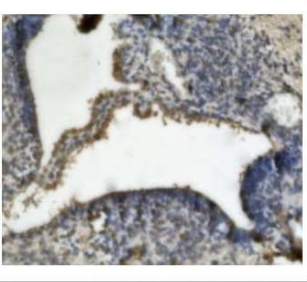
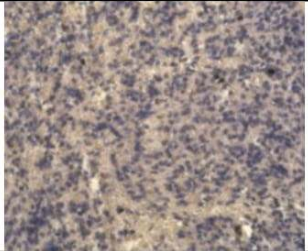
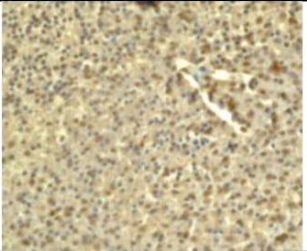
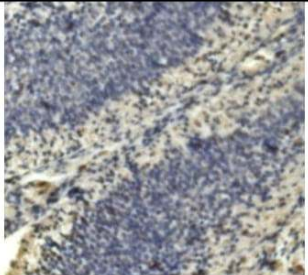
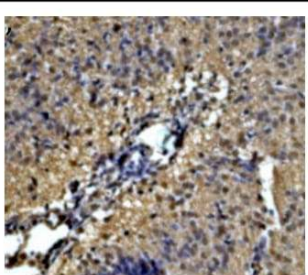
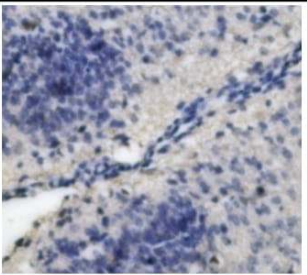
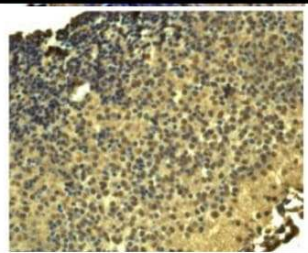
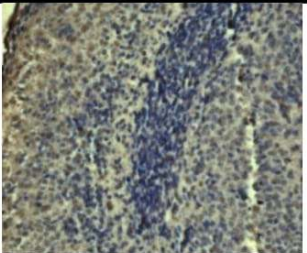
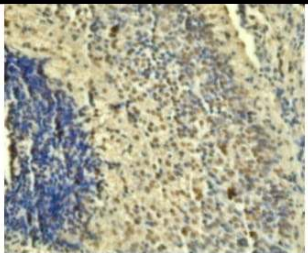
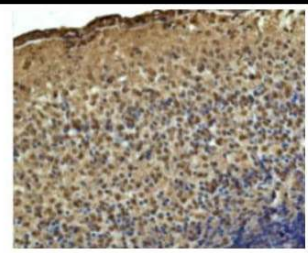
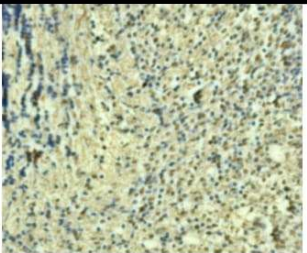
Deney ve tedavi gruplarının Cas3 boyanma özelliklerine göre karşılaştırılmasında lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum ve korpus kallosum bölgelerinde, deney grubunun tedavi grubuna göre daha fazla boyanma özelliği gösterdiği izlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Dentat girus bölgesinde ise deney ve tedavi grupları arasında Cas3 boyanma özelliği açısından fark izlenmemiştir (Tablo XVII).

Tablo XVII: Deney ve Tedavi Gruplarının Cas3 Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	Deney Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,014
Koroid Pleksus	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,014
Talamus	2,33 $\pm$ 0,816	2,5 (1-3)	0,67 $\pm$ 0,816	0,5 (0-2)	=0,013
Septum Pellucidum	1,33 $\pm$ 0,516	1 (1-2)	0,17 $\pm$ 0,408	0 (0-1)	=0,006
Dentat Girus	1,83 $\pm$ 0,753	2 (1-3)	1,0 $\pm$ 0,632	1 (0-2)	=0,06
Korpus Kallosum	1,50 $\pm$ 0,548	1,5 (1-2)	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	=0,011

Her gruptan 6 fare ve her fareden 1 fetus olarak yaptığımız Cas3 immunhistokimyasal boyama sonrası yaptığımız incelemede, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosumda, deney grubunun kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı görülmüştür. Lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum ve korpus kallosumda, deney grubunda, tedavi grubuna göre boyanmanın daha yoğun olduğu, dentat girusta ise benzer yoğunlukta boyanma olduğu görülmüştür. Kontrol ve tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise, yalnızca koroid pleksusta, tedavi grubunun daha yoğun boyandığı görülmüştür. Resim 12’de, Cas3 immunhistokimyasal boyanması yapılmış preparatların, X40 büyütmede incelenen preparat görüntüleri ve karşılaştırmaları verilmiştir.



	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Tedavi Grubu
Lateral Ventrikül			
Koroid Pleksus			
Talamus			
Septum Pellucidum			
Dentat Girus			
Korpus Kallozum			

Resim 12: Cas3 Boyamalarının Işık Mikroskop Görüntüleri (X40)

Kontrol, deney ve tedavi gruplarının Lc3 β boyanma özellikleri karşılaştırılmış ve tüm bölgelerde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Karşılaştırma Tablo XVIII'de verilmiştir.

Tablo XVIII: Kontrol, Deney ve Tedavi Gruplarının Lc3 β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	P
Lateral Ventrikül	=0,007
Koroid Pleksus	=0,011
Talamus	=0,003
Septum Pellucidum	=0,002
Dentat Girus	=0,012
Korpus Kallosum	=0,011

Lc3 β boyanma özelliklerine göre, kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasında, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosum bölgelerinin hepsinde, deney grubunun kontrol grubuna göre daha fazla boyanma özelliği gösterdiği saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Detaylar Tablo XIV'da verilmiştir.

Tablo XIX: Kontrol ve Deney Gruplarının Lc3 β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	Kontrol Grubu		Deney Grubu		P
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	=0,007
Koroid Pleksus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	=0,011
Talamus	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	1,83 $\pm$ 0,408	2 (1-2)	=0,004
Septum Pellucidum	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	1,83 $\pm$ 0,408	2 (1-2)	=0,004
Dentat Girus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	2,0 $\pm$ 0,894	2 (1-3)	=0,012
Korpus Kallosum	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	1,83 $\pm$ 0,753	2 (1-3)	=0,011

Lc3 β boyanma özelliklerine göre, kontrol ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosum bölgelerinin hiçbirinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Tablo XX’de detaylar verilmiştir.

Tablo XX: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Lc3 β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölge	Kontrol Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=0,575
Koroid Pleksus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=1,0
Talamus	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	=1,0
Septum Pellucidum	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	0,17 $\pm$ 0,408	0 (0-1)	=0,523
Dentat Girus	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,575
Korpus Kallosum	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=1,0

Lc3 β boyanma özelliklerine göre, deney ve tedavi gruplarının karşılaştırılmasında, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosum bölgelerinde, deney grubunun tedavi grubuna göre daha fazla boyanma gösterdiği izlenmiştir. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Tablo XXI’de detaylar verilmiştir.

Tablo XXI: Deney ve Tedavi Gruplarının Lc3 β Boyanma Özelliklerinin Karşılaştırılması

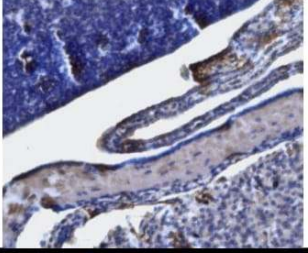
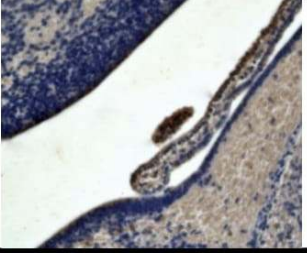
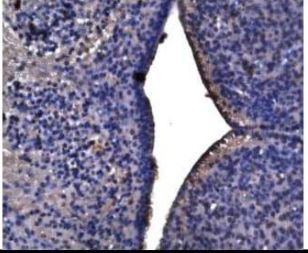
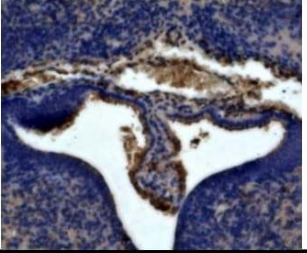
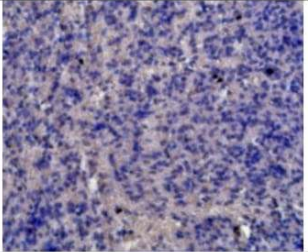
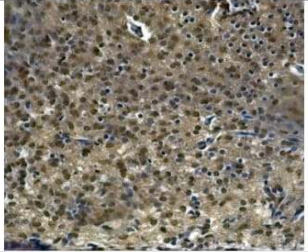
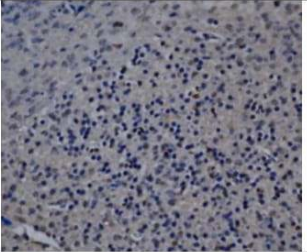
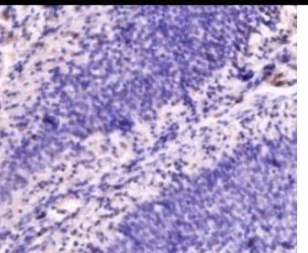
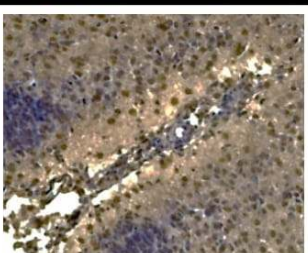
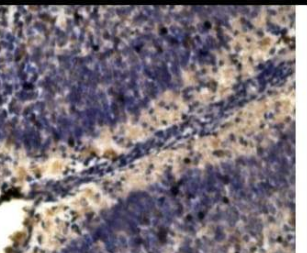
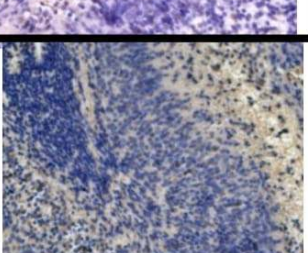
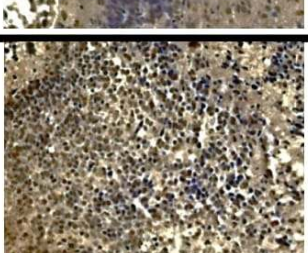
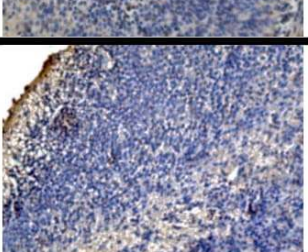
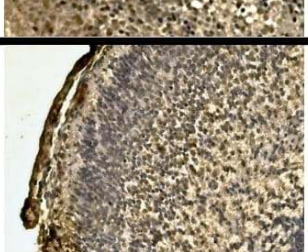
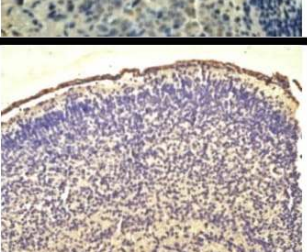
Bölge	Deney Grubu		Tedavi Grubu		p
	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	ortalama $\pm$ SS	Medyan (min-maks)	
Lateral Ventrikül	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=0,011
Koroid Pleksus	1,67 $\pm$ 0,516	2 (1-2)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=0,011
Talamus	1,83 $\pm$ 0,408	2 (1-2)	0,33 $\pm$ 0,516	0 (0-1)	=0,004
Septum Pellucidum	1,83 $\pm$ 0,408	2 (1-2)	0,17 $\pm$ 0,408	0 (0-1)	=0,002
Dentat Girus	2,0 $\pm$ 0,894	2 (1-3)	0,67 $\pm$ 0,516	1 (0-1)	=0,016
Korpus Kallosum	1,83 $\pm$ 0,753	2 (1-3)	0,50 $\pm$ 0,548	0,5 (0-1)	=0,011

Her gruptan 6 fare ve her fareden 1 fetus olarak yaptığımız Lc3 β immunhistokimyasal boyama sonrası yaptığımız incelemede, lateral ventrikül, koroid pleksus, talamus, septum pellucidum, dentat girus ve korpus kallosumda, deney grubunun kontrol grubuna göre ve deney grubunun tedavi grubuna göre daha yoğun boyandığı görülmüştür.

Kontrol ve tedavi grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise bölgeler benzer boyanma özellikleri göstermiştir.

Resim 13’de, Lc3 β immunhistokimyasal boyanması yapılmış preparatların, X40 büyütmede incelenen preparat görüntüleri ve karşılaştırmaları verilmiştir.



	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Tedavi Grubu
Lateral Ventrikül			
Koroid Pleksus			
Talamus			
Septum Pellucidum			
Dentat Girus			
Korpus Kallozum			

Resim 13: Lc3 β Boyamalarının Işık Mikroskop Görüntüleri (X40)

5. TARTIŞMA

Gebe farelerde maternal uygulanan kortizonun, fetus beyin gelişimi üzerindeki etkileri daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Biz de kendi çalışmamızda bu etkileri bir kez daha doğrulayarak, *Centella Asiatica*'nın (CA) fetus beyin gelişimi üzerine potansiyel etkilerini araştırdık.

Gebelerin kronik hastalık, anksiyete, depresyon gibi maruziyetlerine bağlı kortizol seviyesi yüksekliğinin, fetus gelişimi ve büyümesini etkileyen durumlar olduğundan, prenatal stres başlığında bahsetmiştik. Anne stresinin fetuse iletiminde HPA aksın önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Ayrıca maternal stresin, katekolamin seviyelerini etkileyerek, oksidatif stresi tetiklemesi ve maternofetal perfüzyonu bozarak gelişimi engellediği de gösterilmiştir (94). Çalışmamızda, gebe farelere uygulanan deksametazonun, fetus beyinlerinin en, boy ve ağırlık değerlerinde anlamlı azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde, prenatal stresin, fetus beyni üzerinde, nöron maturasyon ve migrasyonunu bozduğu, özellikle hipokampus dentat girus, lateral ventrikül ve korteks kalınlığında azalmaya sebep olduğu, talamus ve mezensefalonda ise hacim artışına sebep olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (5,95).

Çalışmamızda, maternal steroidin, fetus beyin gelişimini bozduğu, beyin boyutlarında kontrol ve tedavi gruplarına göre küçülmeye neden olduğu gözlenmiştir. Prenatal stresin, beyin gelişimi ve işlevleri üzerine olumsuz etkisinin, maternal katekolaminlerin, plasental kan damarlarına vazokonstriksiyon yaptırmasına bağlı gelişen fetal hipoksi nedenli olduğuna dair görüşler ileri sürülmektedir (96). Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında plasentanın, HPA aks üzerinden prenatal stresi düzenleyici etkisi olduğu öne sürülmüştür. Bu çalışmaların, mekanizmaları aydınlatmaya yönelik basamaklarında, kortizolü inaktif formuna dönüştüren bariyer enzim olan 11b-HSD2'nin down regülasyonu üzerinde durulmuştur. Annede yüksek olan bazal kortizol seviyesinin, plasental 11b-HSD2'yi baskılaması ve sonuç olarak fetal maruziyeti arttırarak, aksı bozmasından bahsedilmiştir. Yine plasental NR3C1 ekspresyonun artışı da maternal prenatal stresle ilişkili bulunmuştur. NR3C1, plasentada yüksek oranda eksprese edilen bir nükleer reseptördür ve plasental 11b-HSD2 gen ekspresyonunu upregüle ettiği düşünülmektedir (97).

Çalışmamızda, Hematoksilen Eozin ile yapılan boyama ve görsel karşılaştırmada, hipokampus dentat girus alanının büyüklüğünün, deney grubunda, kontrol ve tedavi gruplarına oranla küçük olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca 3. ventrikül çevresinde de nöron yoğunlaşması olduğu ve nöron boyutlarının küçük olduğu değerlendirilmiştir. Oksijen, embriyonik ve fetal gelişim için gerekli olan en önemli unsurlardan biridir. Oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak, tüm oksijen moleküllerinin %0,2-2'sinin sürekli olarak süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali dahil olmak üzere bir dizi reaktif oksijen türüne (ROS) indirgendiği tahmin edilmektedir. Hücre içi sinyalizasyon için temel rollerine rağmen, aşırı ROS konsantrasyonları, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonu yoluyla ciddi hücre hasarına neden olabilir. Örneğin, hücre içi ROS, küresel DNA-hipo-metilasyona neden olan nükleer DNA'nın epigenetik kontrol mekanizmalarının aktivitesini azaltır ve histon metilasyonunun kontrolüne müdahale eder. Fetal epigenomdaki bu modifikasyonların, HPAA'nın fetal programlamasının altında yatan temel mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. Hücre, enzimatik temizleyiciler ve antioksidan moleküller dahil olmak üzere uygunsuz ROS konsantrasyonlarını nötralize etmek için kapsamlı bir savunma mekanizması geliştirmiştir (98). Bu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları ile ROS üretimi arasındaki bir dengesizlik, büyük ölçüde, fetal programlama mekanizması olarak önemli bir rol oynadığı öne sürülen oksidatif stres (OS) olarak kabul edilmektedir (6). Tetiklenmiş oksidatif stresin, fetal gelişimi, feto maternal kanlanma üzerinden bozduğu öne sürülmüştür (99). Maternal prenatal stresin, IL-1, IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6 TNF alfa gibi inflamatuvar belirteçlerde artışa sebep olduğu belirtilmiştir. Özellikle IL-6 başta olmak üzere, bu inflamatuvar belirteçler, plasentadan geçebilmektedir. IL-6 aracılı arterial kan basıncı artışı ile fetal kanlanma ve oksijenizasyon bozularak HPA aks bozulmakta ve özellikle hipokampus dentat girus gelişiminde geriliğe sebep olmaktadır (99). Tüm bu çalışmalar ışığında, mekanizmaların hala aydınlatılmamış ve merak uyandıran noktaları mevcuttur. Bu sebeple daha geniş araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, deksametazonla birlikte Centella Asiatica uyguladığımız tedavi grubunda, fetus beyin ölçümlerinin, kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür. Bu bize Centella Asiatica'nın beyin gelişimi üzerinde olumlu etkileri olduğunu ve kortizon ile eş zamanlı kullanımında, hasar oluşumunu engellediğini düşündürmüştür. Kumar ve arkadaşlarının Centella Asiatica'nın santral sinir sistemindeki etkilerini anlamayı amaçlayan çalışmasında, oluşturulan oksidatif strese etkileri incelenmiştir. Çalışmada, Centella Asiatica

(150 ve 300 mg/kg p.o) tedavisinin, oksidatif hasarı önemli ölçüde azalttığı, glutatyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz ve katalaz seviyesinin restorasyonu ile gösterilmiştir. Ayrıca, beyin mitokondriyal NADH Dehidrogenaz ve Süksinat Dehidrogenaz seviyelerinde düzenleme sağladığı öne sürülmüştür (86). Bu çalışma bize, *Centella Asiatica*'nın, tetiklenmiş oksidatif stresi azaltarak, beyin gelişiminde, kortizonun etkilerine karşı koruyucu ve iyileştirici bir etken olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, *Centella Asiatica* uygulanan grupta, beyin boyutları ve ağırlığı, deney grubundan daha büyük ve kontrol grubuna yakın bulunmuştur. *Centella Asiatica*'nın, mitokondriyal ve oksidatif fonksiyonları düzenleyerek inflamatuvar yanıtları etkilediği öne sürülmektedir. Mikroglial hücre hattında yapılan bir deneyde, *Centella Asiatica* içeriğinde bulunan asiatic asidin, nükleer faktör kappa aktivasyonunu baskılayarak, Sirtuin 1 ekspresyonunu arttırdığı, indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve nitrik oksit sentezini azalttığı ve bu yolla nöroinflamasyonu önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, NLRP3 ekspresyonunu baskılayarak ve mitokondriyal ROS'u azaltarak, mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (100). Bizim tedavimiz, kortizon uygulaması ile eş zamanlı yapıldığı için, bizim çalışmamızda, oksidatif stres etkileri ortaya çıkmamış olabilir. Bu konuda, daha detaylı çalışmaların yapılması, mekanizmaların anlaşılması açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Hannan ve arkadaşlarının çalışmasında, *Centella Asiatica*'nın hücre kültüründe, nöronal büyümeyi ve nöronal polarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (91). Çalışmada, dozun önemine vurgu yapılmış, yüksek dozlarda, optimal dozda görülen tedavi cevabının oluşmadığı gösterilmiştir. Hücre kültüründe, fetal fare beyin hücreleri kullanılarak, spesifik boyama yöntemleriyle, *Centella Asiatica*'nın, primer hipokampal nöronlarda erken farklılaşmayı arttırdığı, aksodendritik olgunlaşmayı arttırdığı, dentrit dallanmasını arttırdığı ve sinaptik oluşumları arttırdığı gösterilmiştir (91). Kumar ve arkadaşlarının çalışmasında (86), farelerde beyin dokusunda nörotoksisite oluşturulup *Centella Asiatica*'nın nörotoksisite üzerine etkisi incelenmiş, doğru dozda kullanılan *Centella Asiatica*'nın, oksidatif stresi azalttığı ve hasar oluşumunu engellediği öne sürülmüştür. Sari ve arkadaşlarının çalışmasında (101), *Centella Asiatica*'nın etkileri mekanizma düzeyinde incelenmiş ve hipokampus dokusunda Brain Derived Nörotrofik Faktör (BDNF) konsantrasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Hipokampus, glukokortikoid reseptörü ve glutamat içerir ve strese duyarlı hipotalamus-hipofiz-adrenal

(HPA) eksenini düzenler. BDNF, öğrenme ve hafıza süreçlerinde sinapsların gücünü modüle eder ve oksidatif stresin azaltılmasında görev alır. Bu bağlamda, Centella Asiatica'nın oksidatif stresi azalttığı görüşü desteklenmiştir. Centella Asiatica'nın, santral sinir sisteminde, oksidatif stresi azaltarak nörotoksik etkileri önlediği ileri sürülmüştür (12). Prenatal stresin oksidatif stresi arttırdığını bildiğimize göre, Centella Asiatica'nın iyileştirici mekanizmalarından biri olarak, oksidatif stresi azaltmasını öne sürebiliriz.

Çalışmamızda, semikantitatif olarak krezil viyole boyama sonrası yaptığımız nöron sayımında, deney grubunda, diğer gruplara göre, 3.ventrikül, talamus, septum pellucidumda, nöron sayısı anlamlı olarak yüksek bulunurken, nöronların gözlemsel olarak boyutlarının küçük olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, prenatal stresin serebellum üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, prenatal strese maruz kalan gruplarda nöron sayısının arttığı ileri sürülmüştür (102). Huang ve arkadaşlarının çalışmasında, prenatal stresin, korpus kallosumda, non-miyelinize akson oranını arttırdığı, toplam akson sayısını değiştirmedeği gösterilmiştir. Çalışmada, toplam akson sayısının değişmemesi, uygulanan kortizonun toksik doza ulaşmamasına bağlanmıştır (103). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda deney grubunda nöron sayısını fazla bulmamızı ve gözlemsel olarak nöron boyutlarının küçük olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Biz, prenatal stres grubunda nöron sayısının artışının nöronal göç ve matürasyon gecikmesine bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Bu konuda daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda, deney grubunda, taklit edilen prenatal stres ile, apoptoza gidişte artış mevcuttur. İmmunhistokimyasal olarak Cas3 boyaması değerlendirmemize göre, deney grubunda apoptoz, kontrol ve tedavi grubundan fazla bulunmuştur. Benzer şekilde, Mürin hücre hattında deksametazon uygulaması yapılan bir çalışmada, Cas3 etkinliği ile apoptoza gidişin arttığı öne sürülmüştür. ROS tetiklenmesi, mitokondriyal hasar oluşumu, temel mekanizmalar olarak öngörülmüş, hücre içi mekanizmalar ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir. Çalışmada, NADH dehydrogenase , cytochrome b (Cyt B), cyclooxygenase (Cox)-2 ve Cox-3, Cox-1 gen ekspresyon artışı tespit etmişlerdir. Katalaz ve superoksit dismutaz (SOD) seviyelerinde azalış ile oksidatif stresin tetiklenerek apoptoza gidiş olduğunu öne sürmüşlerdir (104). Mekanizmaların daha iyi aydınlatılması için bu alanda daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda, fetus beyni üzerinde, Centella Asiatica'nın, kortizon tarafından tetiklenen apoptoza gidişi engellediği ve incelenen dönem içinde (kısa vade) hasar oluşumunu azalttığı, Cas3 immunhistokimyasal boyaması ile gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Alzheimer hastalığında, Centella Asiatica'nın, apoptozu azalttığı gösterilmiş ve mekanizması araştırılmıştır. Centella Asiatica'nın NF- κ B, p65 translokasyonunu inhibe ettiği ve bunun yanında, TNF- α , IL-6, TLR4, MyD88, TRAF6 ve p-NF- κ B p65'in Alzheimer hastalığında artmış olan seviyelerini düşürerek, apoptozu baskıladığını göstermişlerdir. Altında yatan olası moleküler mekanizmanın, TLR4/NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu olabileceğini savunmuşlardır (105). Başka bir çalışmada, diyabetik ratlarda, Centella Asiatica'nın beyin üzerine etkileri incelenmiş ve diyabetik rat beyinde azalan Bcl-2 antiapoptotik proteinin seviyesini arttırdığı, Cas3 ve Cas9 seviyelerini azalttığı gözlenmiş, bu yolla apoptoz üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada ayrıca, Centella Asiatica'nın, diyabetik ratlarda, beyin dokusunda artmış saptanan NF- κ B p65 protein seviyesini azaltarak inflamasyonu azalttığı ileri sürülmüştür (106). Qi ve arkadaşlarının çalışmasında (107), fare embriyo hücre kültüründe, önce Centella Asiatica uygulanmış ardından nörotoksik düzeyde NMDA uygulanmıştır. Çalışmada sonuç olarak, Centella Asiatica'nın, apoptoza gidişi Bax/Bcl2 oranını değiştirerek azalttığı, NMDA reseptörlerinden NR2B down regülasyonu ile nörotoksik etkinin oluşmasını engellediği ileri sürülmüştür. Bu çalışmayı, diğer çalışmalardan ve bizim çalışmamızdan ayıran temel özelliğin, toksisite oluşturmada Centella Asiatica uygulanması olduğunu düşünüyoruz. Yolakların aydınlatılması ve klinik uygulamaların yapılabilmesi için bu konuda araştırmaların devam etmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda, prenatal stresi taklit ettiğimiz deney grubunda, otofaji markeri Lc3 β seviyesinde immunhistokimyasal olarak anlamlı artış görülmüştür. Prenatal stresin hipokampus üzerindeki etkilerini ve otofaji ilişkisini incelemek için yapılan bir çalışmada BECN1 ve Atg7 seviyelerinde ve LC3II/LC3I oranında artışa bağlı olarak otofajinin, kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu ileri sürülmüştür. Otofaji, fetal dönemde ve özellikle santral sinir sistemi gelişiminde fizyolojik seviyelerde gerekli ve pilastisite için de gerekli bir yoldur. Bu çalışmada, maternal kronik stres durumunda, otofajinin anormal şekilde aktive olduğu ve özellikle hipokampus gelişimini bozduğu öne sürülmüştür (108). Deney grubumuzda hem apoptoz hem otofajinin diğer gruplardan fazla olması, bize 'otofaji bir hayatta kalma mücadelesi olabilir mi?' sorusunu düşündürmüştür. Bu konuda yapılacak ileri çalışmaların, konuyu aydınlatmaya katkı sunacağını düşünüyoruz.

Çalışmamızda, optimal doz *Centella Asiatica* kullanılarak, otofajinin anlamlı şekilde azaldığı ve prenatal stresin etkilerinin azaldığı gözlenmiştir. Hayvan ve kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada, *Centella Asiatica* uygulamasının doza bağlı olarak apoptozu uyardığı öne sürülmüştür (109). Apoptozu uyaran doz, bizim deney dozumuzun yaklaşık 4 katıdır. Çalışmanın devamında otofaji incelemesi de yapılmıştır. Mitokondriyal hasar otofaji için de önemlidir. LC3-I'in (19 kD) LC3-II'nin (17 kD) preotofagozomal ve otofagozomal membrana bağlı formuna (otofagozom oluşumu için özel bir işaretçi) dönüştürüldüğüne dair kanıt aranarak analiz edilmiştir. *Centella Asiatica* uygulaması sonrası, doza bağımlı olarak, A549 hücrelerinde LC3 etiketli vakuollerin oluşumu belirgin şekilde arttığı öne sürülmüştür. LC3-I'den LC3-II'ye dönüşüm ile otofajinin tetiklendiği belirtilmiştir (109). Bu çalışma bize *Centella Asiatica*'nın örnek optimal dozlar haricinde kullanıldığı çalışmaların artması gerektiğini ve kanser alanında umut vadeden sonuçların olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, Lc3β immunohistokimyasal boyama yöntemi ile, otofajinin, *Centella Asiatica* uygulanan tedavi grubunda, deney grubuna göre daha az olduğunu gözlenmiştir. *Centella Asiatica*'nın otofaji üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı sonrası artan otofajiye, *Centella Asiatica*'nın etkileri incelenmiştir. Çalışmada hem hücre kültürü hem hayvan deneyleri ile alınan sonuçlarda, *Centella Asiatica*'nın Bcl-2 seviyesini artırıp Beclin 1 seviyesini azaltarak ve Lc3II/I seviyesini azaltarak otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir (110). Bu sonuç bize, *Centella Asiatica*'nın antiinflamatuvar ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi sayesinde hasarı geri çevirebildiği için, otofajiye yönelen hücre sayısının fizyolojik seviyede olduğunu düşündürmüştür. Bu konuda detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gebelik süresince anne vücudunda gelişen stres reaksiyonları, büyük oranda yavruyu etkilemekte ve çocukluk ve yetişkinlik döneminde etkileri devam eden nörolojik ve psikiyatrik problemlere yol açabilmektedir. Prenatal stres ve kalıcı olabilen uzun dönem etkilerine karşı koruyucu tıp, ana sağlığı, gebelik izlemleri önem taşımakta ve fayda sağlamaktadır ancak prenatal stresin bütün nedenlerinin kontrol edilebilir olmadığı göz önünde bulundurulursa, tedavi çalışmalarının da önemli olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda, taklit edilen prenatal stres modelinde, Centella Asiatica'nın, strese bağlı ortaya çıkan olumsuz etkileri geri döndürebileceğine dair bulgular elde ettik. Kortizon uygulaması ile stres ortamını taklit ederek, beraberinde Centella Asiatica uygulanan tedavi grubunun, fetal beyin ölçümlerinin, stres oluşturulmayan kontrol grubu ile benzer olduğunu gözlemledik. Centella Asiatica'nın, beyin dokusunda apoptozu ve otofajiyi baskıladığını, immunohistokimyasal boyama bulguları ile ortaya koyduk. Bu alanda yapılan diğer çalışmalarda da santral sinir sistemi patolojilerinin, Centella Asiatica tedavisinden fayda görebileceğine dair umut verici bulgular elde edilmiştir.

Bizim çalışmamızın ve çoğu çalışmanın da elde ettiği, santral sinir sisteminde, Centella Asiatica'nın kısa vadede olumlu etkilerini doğrulamak ve tedavinin gerçek etkilerini, güvenilirliğini ortaya çıkarmak amacıyla, daha geniş gruplarda, daha uzun periyodlu çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılan Centella Asiatica'nın, modern tıpta cilt patolojilerinden sonra santral sinir sisteminde de etkili olduğunu ve etki mekanizmalarını ortaya koyan çalışmalar, geleneksel tıp anlayışının “alternatif” olmak yerine bilimsel altyapısının ve güvenilirliğinin belirlenmesi, etkilerinin ve etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması açısından önemli olduğunu düşünüyoruz. Bu bağlamda, geleneksel tıpta, uzun süre yaygın kullanılmış maddelerle yapılacak bilimsel araştırmaların teşvik edilmesinin önemli olduğunu düşünüyoruz.

ÖZET

GEBE FARELERDE STEROİD İLE İNDÜKLENMİŞ PRENATAL STRES KAYNAKLI FETAL BEYİN GELİŞİM HASARINDA CENTELLA ASIATICA'NIN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DEMİRKAYA TAŞ D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, 2022

Gebelik süresince yavrunun maruz kaldığı stres faktörleri, prenatal stres olarak tariflenmekte ve çocuklukta ve yetişkinlikte karşılaşılan psikososyal problemlerin nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bilişsel davranışsal, fiziksel ve duygusal problemler ve otizmle, prenatal stresin ilişkisini açıklayan çokça araştırma mevcuttur.

Farklı hayvan türlerinde yapılan in vivo çalışmalarda, deksametazon veya betametazon formundaki sentetik glukokortikoid tedavisinin maternal uygulanmasının, fetal nöronal hücre çoğalmasını azalttığını ve yavruların hipokampus dentat girus ve neokorteksindeki nörojenezi inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Geleneksel Asya tıbbında, yüzyıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılan Centella Asiatica, Apiaceae ailesinden olan otsu ve çok yıllık bir bitkidir. Modern tıpta da özellikle cilt hastalıklarında, uzun süredir kullanılmaktadır. Yara ve yanık tedavisinde, sedef, egzema, keloid, hipertrofik skar gibi cilt hastalıklarında etkili olduğunu öne süren bilimsel araştırmalar mevcuttur. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda Centella Asiatica'nın, cilt dışında, özellikle santral sinir sisteminde de önemli etkilerinin olduğunu öne sürmektedir. Centella Asiatica'nın nöroprotektif, anksiyolitik, antikonvülzan, nörojenik, sinaps artırıcı etkilerinin olduğu ve bu yolla Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı, inme gibi durumların tedavisinde faydalı olabileceğine dair görüşler öne sürülmektedir.

Çalışmamızda, gebe farelerde intraperitoneal kortizon uygulanarak prenatal stres ortamı taklit edilmiş olup, oluşan fetal beyin gelişim hasarında, oral Centella Asiatica uygulamasının etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda, 18 adet dişi ve 9 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanılmış ve gebelik oluşması sağlanmıştır. Fareler kontrol (n=6), deney (n=6) ve tedavi grubu (n=6) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Gebeliğin 9-15. günleri arasında toplam 5 gün, kontrol grubuna intraperoitoneal yolla 1mg/kg/gün Serum Fizyolojik (SF); deney grubuna intraperoitoneal yolla 1mg/kg/gün deksametazon; tedavi grubuna intraperoitoneal yolla 1mg/kg/gün deksametazon ile birlikte oral gavaj yoluyla 1mL/kg/gün Centella Asiatica verilmiştir. 18,5. günde gebelikler sonlandırılarak, embriyo beyinleri diseke edilmiş ve formaldehitte tespit edilmiştir. Fetus boyları (cm) ve fetal beyinlerin en (cm), boy (cm) ve ağırlıkları ölçülmüş, kayıt altına alınmıştır. İnceleme için, hematoksilin-eozin boyama, krezil viyole boyama ve immünohistokimyasal boyama (Cas3 ve Lc3β) yapılmıştır.

Çalışmamızda, gebe farelere uygulanan deksametazonun, fetus beyinlerinin en, boy ve ağırlık değerlerinde anlamlı azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, deksametazonla birlikte Centella Asiatica uyguladığımız tedavi grubunda, fetus beyin ölçümlerinin, kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür. Centella Asiatica'nın apoptoza gidişi engellediğine dair kanıtlar mevcuttur. Bizim çalışmamızda da, Cas3 immunohistokimyasal boyamasıyla yapılan incelemelerde, Centella Asiatica uygulamasının apoptozu gidişi engellediği ve incelenen dönem içinde (kısa vade) hasar oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Centella Asiatica'nın otofaji üzerine de baskılayıcı etkileri öne sürülmektedir. Bizim çalışmamızda da, Lc3β immunohistokimyasal boyama yöntemi ile, otofajinin, Centella Asiatica uygulanan tedavi grubunda, deney grubuna göre daha az olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimler: Prenatal stres, Centella Asiatica, madecassoid, gotu kola, apoptoz, otofaji

SUMMARY

INVESTIGATION OF CENTELLA ASIATICA'S EFFECT ON FETAL BRAIN DAMAGE CAUSED BY STEROID-INDUCED PRENATAL STRESS ON PREGNANT MICE

**DEMİRKAYA TAŞ D. Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine
Department of Histology and Embryology, 2022**

Stress factors that the offspring are exposed to during pregnancy are defined as prenatal stress and appear as the cause of psychosocial problems in childhood and adulthood. There is a great deal of research that explains the relationship between prenatal stress and cognitive behavioral, physical and emotional problems and autism.

In vivo studies in various animal species have shown that maternal administration of synthetic glucocorticoid therapy such as of dexamethasone or betamethasone inhibits neurogenesis and reduces fetal neuronal cell proliferation in the neocortex and hippocampus dentate gyrus of the offspring.

Centella Asiatica, which has been used in traditional Asian medicine for centuries to treat many diseases, is a herbaceous and perennial plant from the Apiaceae family. It has been used in modern medicine for a long time, particularly in skin diseases. There are studies suggesting that it is effective in the treatment of scars and burns; and skin diseases such as psoriasis, eczema, keloid, and hypertrophic scars. Recent studies suggest that Centella Asiatica has important effects apart from the skin, notably in the central nervous system. It has been suggested that Centella Asiatica has neuroprotective, anxiolytic, anticonvulsant, neurogenic, synapse-enhancing effects and that it may be useful in the treatment of conditions such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's disease and stroke.

In our study, the effects of oral Centella Asiatica administration on fetal brain damage caused by prenatal stress environment imitated by intraperitoneal administration of cortisone on pregnant mice were investigated.

In our study, 18 female and 9 male Balb/c mice were used and pregnancy was achieved. Mice were divided into three groups as control (n=6), test (n=6) and treatment group (n=6). Between the 9th and 15th days of pregnancy, for a total of 5 days, 1mg/kg/day normal saline (N/S) administrated to the control group intraperitoneally; 1mg/kg/day dexamethasone administrated to the test group intraperitoneally; the treatment group received 1mg/kg/day dexamethasone by intraperitoneal route and 1mL/kg per day Centella Asiatica by oral gavage. Pregnancies were terminated on the 18,5th day, embryo brains were dissected and fixed in formaldehyde. Fetal lengths (cm) and width (cm), height (cm) and weights of the fetal brains were measured and recorded. For analysis, hematoxylin-eosin staining, cresyl violet staining and immunohistochemical staining (Cas3 and Lc3 β) were performed.

In our study, it was observed that dexamethasone administration to the pregnant mice caused a significant decrease in fetal brain width, height and weight values. However, in the treatment group in which we administrated dexamethasone and Centella Asiatica, fetal brain measurements were similar to the control group. There is evidence that Centella Asiatica inhibits the progression to apoptosis. In our study, it was observed that Centella Asiatica administration prevented the progression to apoptosis and reduced the formation of damage in the examined period (short term) with the analyses performed using Cas3 immunohistochemical staining. It has also been suggested that Centella Asiatica has suppressive effects on autophagy. In our study, with Lc3 β immunohistochemical staining method, autophagy was observed to be less in the treatment group treated with Centella Asiatica compared to the test group.

Keywords: Prenatal stress, Centella Asiatica, madecassoid, gotu kola, apoptosis, autophagy

7. KAYNAKLAR

1. King S, Laplante DP. The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm. *Stress*. 2005 Mar;8(1):35–45.
2. Fatima M, Srivastav S, Mondal AC. Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Aug 1;60:1–7.
3. Huizink AC, Mulder EJH, Buitelaar JK. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull*. 2004;130(1):115–42.
4. Xu D, Chen M, Pan X liang, Xia L ping, Wang H. Dexamethasone induces fetal developmental toxicity through affecting the placental glucocorticoid barrier and depressing fetal adrenal function. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011 Nov;32(3):356–63.
5. Krontira AC, Cruceanu C, Binder EB. Glucocorticoids as mediators of adverse outcomes of prenatal stress. *Trends Neurosci*. 2020 Jun 1;43(6):394–405.
6. Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*. 2012;2012:1–8.
7. Skupio U, Tertilt M, Sikora M, Golda S, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: Relevance to depression. *Neuroscience*. 2015 Feb;286:141–50.
8. Çayakar A. Steroid usage in clinical practice. *Ulusal Romatoloji Dergisi*. 2021 Aug 1;13(2):73–84.
9. Bylka W, Znajdek-Awiżeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2013;1:46–9.
10. Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK. Pharmacological review on *centella asiatica*: A potential herbal cure-all. *Indian J Pharm Sci*. 2010 Sep;72(5):546.
11. Park JH, Choi JY, Son DJ, Park EK, Song MJ, Hellström M, et al. Anti-inflammatory effect of titrated extract of *centella asiatica* in phthalic anhydride-induced allergic dermatitis animal model. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 30;18(4).
12. Chen CL, Tsai WH, Chen CJ, Pan TM. *Centella asiatica* extract protects against amyloid β 1-40-induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system. *J Tradit Complement Med*. 2016 Oct 1;6(4):362–9.

13. Gray NE, Zweig JA, Murchison C, Caruso M, Matthews DG, Kawamoto C, et al. Centella asiatica attenuates A β -induced neurodegenerative spine loss and dendritic simplification. *Neurosci Lett*. 2017 Apr 12;646:24–9.
14. Gray NE, Harris CJ, Quinn JF, Soumyanath A. Centella asiatica modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *J Ethnopharmacol*. 2016 Mar;180:78–86.
15. Shinomol GK, Muralidhara. Effect of Centella asiatica leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice in vivo and its in vitro efficacy to ameliorate 3-NPA-induced oxidative stress in mitochondria. *Phytomedicine*. 2008 Nov;15(11):971–84.
16. Gray NE, Alcazar Magana A, Lak P, Wright KM, Quinn J, Stevens JF, et al. Centella asiatica - Phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochem Rev*. 2018 Feb 1;17(1):161–94.
17. Chanana P, Kumar A. Possible involvement of nitric oxide modulatory mechanisms in the neuroprotective effect of centella asiatica against sleep deprivation induced anxiety like behaviour, oxidative damage and neuroinflammation. *Phytotherapy Research*. 2016 Apr;30(4):671–80.
18. Torbati FA, Ramezani M, Dehghan R, Amiri MS, Moghadam AT, Shakour N, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacological features of centella asiatica: A comprehensive review. In 2021. p. 451–99.
19. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 6th ed. Vol. 2. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2014. 211–352 p.
20. Washke J, Böckers T, Paulsen F. Sobotta anatomi konu anlatımı. Sargon MF, editor. Elsevier GmbH; 2016. 596–650 p.
21. Taner D, editor. *Fonksiyonel nöroanatomi*. 20th ed. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim AŞ. ; 2018. 26–282 p.
22. Atalar MH. Beyin gelişimi ve miyelinasyon. *Türk Radyoloji Seminerleri*. 2020 Jun 5;7(3):294–305.
23. Sadler TW. Central nervous system. In: *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer; 2015. p. 306–42.
24. Douglas J G. Development of Nervous System. In: *BRS Neuroanatomy*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019. p. 58–94.

25. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 5th ed. Mosby, Elsevier Inc.; 2014. 200–740 p.
26. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas: İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile. Baykal B, editor. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017. 381–402 p.
27. Moore KL, Persaude TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 10th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2016. 379–416 p.
28. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S, editors. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006. 161–188 p.
29. 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 Jul 1;106–107:1–16.
30. Gilbert SF. Developmental Biology . 7th ed. Chapter:13; 2000. 364–397 p.
31. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. . *J Pathol.* 2010;220(2):217–30.
32. Chen VS, Morrison JP, Southwell MF, Foley JF, Bolon B, Elmore SA. Histology atlas of the developing prenatal and postnatal mouse central nervous system, with emphasis on prenatal days E7.5 to E18.5. *Toxicol Pathol.* 2017 Aug 11;45(6):705–44.
33. Kinney D, Munir K, Crowley D, Miller A. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008 Oct;32(8):1519–32.
34. Rodriguez A, Bohlin G. Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children? *Journal of Child Psychology and Psychiatry.* 2005 Mar;46(3):246–54.
35. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev.* 2010 Oct;65(1):56–79.
36. Beydoun H, Saftlas AF. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008 Sep 1;22(5):438–66.
37. Gué M, Bravard A, Meunier J, Veyrier R, Gaillet S, Recasens M, et al. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behavioural Brain Research.* 2004 Apr;150(1–2):149–57.
38. Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats.

- Physiol Behav. 1998 Jun 15;64(4):439–44.
39. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Dec 1;29(8):1201–13.
 40. Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev*. 1986 Mar;11(1):65–76.
 41. Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Aug;32:S10–5.
 42. Çorumlu EP, Ulupınar E. Prenatal stres maruziyetinin nörobiyolojik etkileri. *Osmangazi Journal of Medicine*. 2016 Mar 8;38(0):38.
 43. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Jun;3(6):479–88.
 44. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatric Research* 2000 47:3. 2000;47(3):291–300.
 45. Bruschetti M, van den Hove DLA, Gazzolo D, Steinbusch HWM, Blanco CE. Lowering the dose of antenatal steroids: The effects of a single course of betamethasone on somatic growth and brain cell proliferation in the rat. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 May;194(5):1341–6.
 46. Arad I, Durkin MS, Hinton VJ, Kuhn L, Chiriboga C, Kuban K, et al. Long-term cognitive benefits of antenatal corticosteroids for prematurely born children with cranial ultrasound abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Apr;186(4):818–25.
 47. Garbrecht MR, Klein JM, Schmidt TJ, Snyder JM. Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Neonatology*. 2006;89(2):109–19.
 48. Goldstein JM, Holsen L, Huang G, Hammond BD, James-Todd T, Cherkerzian S, et al. Prenatal stress-immune programming of sex differences in comorbidity of depression and obesity/metabolic syndrome. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016 Dec 31;18(4):425–36.
 49. Wynne K, Rowe C, Delbridge M, Watkins B, Brown K, Addley J, et al. Antenatal corticosteroid administration for foetal lung maturation. *F1000Res*. 2020 Mar 30;9:219.

50. Bandoli G, Palmsten K, Forbess Smith CJ, Chambers CD. A review of systemic corticosteroid use in pregnancy and the risk of select pregnancy and birth outcomes. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2017 Aug;43(3):489–502.
51. Adams DF, Ment LR, Vohr B. Antenatal therapies and the developing brain. *Seminars in Neonatology*. 2001 Apr;6(2):173–83.
52. Cavalieri RL, Cohen WR. Antenatal steroid therapy: Have we undervalued the risks? *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2006 Jan 7;19(5):265–9.
53. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Kumar V, Abbas A, Aster J, editors. Philadelphia: Elsevier Inc; 2017. 32–218 p.
54. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. 2001 Jan;26(1):61–6.
55. Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32(1):35–46.
56. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*. 2001 Jun;26(6):390–7.
57. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*. 2003 Nov;15(11):983–92.
58. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug 1;2(8):594–604.
59. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005 Nov 1;37(11):719–27.
60. Wang S ya, Yu Q jia, Zhang R dian, Liu B. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Sep;43(9):1263–6.
61. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan;132(1):27–42.
62. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010 Oct;40(2):280–93.
63. Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, et al. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol*. 2019 May 31;17(5):e3000301.
64. Li H, Wu J, Shen H, Yao X, Liu C, Pianta S, et al. Autophagy in hemorrhagic stroke:

- Mechanisms and clinical implications. *Prog Neurobiol.* 2018 Apr;163–164:79–97.
65. Sun Y, Zhu Y, Zhong X, Chen X, Wang J, Ying G. Crosstalk between autophagy and cerebral ischemia. *Front Neurosci.* 2019 Jan 14;12.
 66. Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal.* 2008 Feb 15;410(1):1–17.
 67. Wirawan E, Lippens S, vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, et al. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy.* 2012 Jan 27;8(1):6–17.
 68. Evangelisti C, Evangelisti C, Chiarini F, Lonetti A, Buontempo F, Neri LM, et al. Autophagy in acute leukemias: A double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2015 Jan;1853(1):14–26.
 69. Jawhari S, Ratinaud MH, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone ‘ménage-à-trois.’ *Cell Death Dis.* 2016 Oct 27;7(10):e2434–e2434.
 70. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Mar;2(3):211–6.
 71. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* 2011;12(7):226.
 72. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016 Dec 13;21(1):29.
 73. Lippai M, Löw P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–11.
 74. Islam Md, Sooro M, Zhang P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 May 8;19(5):1405.
 75. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. Malta: World Health Organization; 1999. 77–83 p.
 76. Mangas S, Moyano E, Osuna L, Cusido RM, Bonfill M, Palazón J. Triterpenoid saponin content and the expression level of some related genes in calli of *Centella asiatica*. *Biotechnol Lett.* 2008 Oct 25;30(10):1853–9.
 77. Hashim P, Sidek H, Helan MHM, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M. Triterpene composition and bioactivities of *centella asiatica*. *Molecules.* 2011 Feb;16(2):1310–22.

78. Lee J, Jung E, Kim Y, Park J, Park J, Hong S, et al. Asiaticoside induces human collagen i synthesis through TGF β receptor i kinase (T β RI Kinase)-independent smad signaling. *Planta Med.* 2006 Jan;72(4):324–8.
79. Lee JH, Kim HL, Lee MH, You KE, Kwon BJ, Seo HJ, et al. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine.* 2012 Oct 15;19(13):1223–7.
80. Kwon KJ, Bae S, Kim K, An IS, Ahn KJ, An S, et al. Asiaticoside, a component of *Centella asiatica*, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma. *Mol Med Rep.* 2014 Jul;10(1):503–7.
81. Gallego A, Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon HR, Hidalgo D, Lalaleo L, Khan Kayani W, et al. Biotechnological production of centellosides in cell cultures of *centella asiatica* (L) Urban. *Eng Life Sci.* 2014 Nov;14(6):633–42.
82. Ratz-lyko A, Arct J, Pytkowska K. Moisturizing and antiinflammatory properties of cosmetic formulations containing *Centella asiatica* extract. *Indian J Pharm Sci.* 2016;78(1):27.
83. Awad R, Levac D, Cybulska P, Merali Z, Trudeau VL, Arnason JT. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ -aminobutyric acid (GABA) system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Sep;85(9):933–42.
84. Visweswari G, Prasad KS, Chetan PS, Lokanatha V, Rajendra W. Evaluation of the anticonvulsant effect of *Centella asiatica* (gotu kola) in pentylenetetrazol-induced seizures with respect to cholinergic neurotransmission. *Epilepsy & Behavior.* 2010 Mar;17(3):332–5.
85. Tabassum R, Vaibhav K, Shrivastava P, Khan A, Ejaz Ahmed Md, Javed H, et al. *Centella asiatica* attenuates the neurobehavioral, neurochemical and histological changes in transient focal middle cerebral artery occlusion rats. *Neurological Sciences.* 2013 Jun 4;34(6):925–33.
86. Kumar A, Prakash A, Dogra S. *Centella asiatica* attenuates D-Galactose-induced cognitive impairment, oxidative and mitochondrial dysfunction in mice. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:1–9.
87. Gray NE, Morré J, Kelley J, Maier CS, Stevens JF, Quinn JF, et al. Caffeoylquinic acids in *centella asiatica* protect against Amyloid- β toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2014 Mar 31;40(2):359–73.

88. Soumyanath A, Zhong YP, Henson E, Wadsworth T, Bishop J, Gold BG, et al. Centella asiatica extract improves behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease: Investigation of a possible mechanism of action. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:1–9.
89. Dhanasekaran M, Holcomb LA, Hitt AR, Tharakan B, Porter JW, Young KA, et al. *Centella asiatica* extract selectively decreases amyloid β levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytotherapy Research.* 2009 Jan;23(1):14–9.
90. Mitha K, Yadav S, Ganaraja B. Improvement in Cognitive Parameters Among Offsprings Born to Alcohol Fed Female Wistar Rats Following Long Term Treatment with Centella Asiatica. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2016;60(2):167–73.
91. Hannan MdA, Haque MN, Munni YA, Oktaviani DF, Timalina B, Dash R, et al. Centella asiatica promotes early differentiation, axodendritic maturation and synaptic formation in primary hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2021 Mar;144:104957.
92. Matthews DG, Caruso M, Murchison CF, Zhu JY, Wright KM, Harris CJ, et al. Centella Asiatica improves memory and promotes antioxidative signaling in 5XFAD mice. *Antioxidants.* 2019 Dec 8;8(12):630.
93. Dhanasekaran M, Holcomb LA, Hitt AR, Tharakan B, Porter JW, Young KA, et al. Centella Asiatica extract selectively decreases amyloid β levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytotherapy Research.* 2009 Jan;23(1):14–9.
94. Rakers F, Rupprecht S, Dreiling M, Bergmeier C, Witte OW, Schwab M. Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020 Oct;117:185–97.
95. Graham AM, Doyle O, Tilden EL, Sullivan EL, Gustafsson HC, Marr M, et al. Effects of maternal psychological stress during pregnancy on offspring brain development: considering the role of inflammation and potential for preventive intervention. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2022 May;7(5):461–70.
96. Weinstock M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Jan;21(1):1–10.
97. Glover V, O'Donnell KJ, O'Connor TG, Fisher J. Prenatal maternal stress, fetal programming, and mechanisms underlying later psychopathology—A global perspective. *Dev Psychopathol.* 2018 Aug 2;30(3):843–54.
98. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett.* 2009

- Jan;12(1):75–92.
99. Rakkers F, Rupprecht S, Dreiling M, Bergmeier C, Witte OW, Schwab M. Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 Oct;117:185–97.
 100. Wong JH, Barron AM, Abdullah JM. Mitoprotective effects of centella asiatica (L.) urb.: Anti-inflammatory and neuroprotective opportunities in neurodegenerative disease. *Front Pharmacol*. 2021 Jun 29;12.
 101. Sari DCR, Arfian N, Tranggono U, Setyaningsih WAW, Romi MM, Emoto N. Centella asiatica (Gotu kola) ethanol extract up-regulates hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine kinase B (TrkB) and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in chronic electrical stress model in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2019 Oct 1;22(10):1218–24.
 102. Ulupinar E, Yucel F, Ortug G. The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. *Neurotoxicol Teratol*. 2006 Jan;28(1):86–94.
 103. Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2001 Jul 22;19(4):415–25.
 104. Mutsaers HAM, Tofighi R. Dexamethasone enhances oxidative stress-induced cell death in murine neural stem cells. *Neurotox Res*. 2012 Aug 12;22(2):127–37.
 105. Song D, Jiang X, Liu Y, Sun Y, Cao S, Zhang Z. Asiaticoside attenuates cell growth inhibition and apoptosis induced by A β 1-42 via Inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human brain microvascular endothelial cells. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 30;9.
 106. Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Nelli SR, Salleh N. Oral administration of Centella asiatica (L.) Urb leave aqueous extract ameliorates cerebral oxidative stress, inflammation, and apoptosis in male rats with type-2 diabetes. *Inflammopharmacology*. 2020 Dec 25;28(6):1599–622.
 107. Qi F yan, Yang L, Tian Z, Zhao M gao, Liu S bing, An J ze. Neuroprotective effects of Asiaticoside. *Neural Regen Res*. 2014;9(13):1275.
 108. Zhang H, Shang Y, Xiao X, Yu M, Zhang T. Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Exp Neurol*. 2017 Dec;298:68–78.

109. Wu T, Geng J, Guo W, Gao J, Zhu X. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro and in vivo by destroying mitochondria. *Acta Pharm Sin B*. 2017 Jan;7(1):65–72.
110. Yi C, Si L, Xu J, Yang J, Wang Q, Wang X. Effect and mechanism of asiatic acid on autophagy in myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro. *Exp Ther Med*. 2020 Sep 4;20(5):1–1.



EK-1: ETİK KURUL KARARI



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 18/03/2021

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı III. Oturum
Sayı : 64583101/2021/034
Proje Başlığı : Gebe Farelerde Steroid ile İndüklenmiş Prenatal Stres Kaynaklı Fetal Beyin Gelişim Hasarında Centella Asiatica'nın Ekisinin İncelenmesi.
Proje Yürütücüsü : Kemal ERGİN
Proje Ekibi : Damla Demirkaya TAŞ
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Turhan DOST
Üye

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

Dr. Öğr. Üyesi solmaz KARAARSLAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAĞ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ
Sor. Vet. Hek.
Üye

Hidayet YAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Gülce
GÜLER Sor. Vet. Hek.
Üye

Mustafa ÇOBANOĞLU
Sivil Üye

Şenay TEKİNBAŞ
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.