

TUBA TAPAN

YÜKSEK LİSANS 2012

TFİZ Y-8

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

**NEONATAL LPS UYGULAMASI ve
ÜREMENİN UZUN VADELİ
PROGRAMLANMASI: NOS ve KASPAZ-1
İNHİBİSYONLARININ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuba TAPAN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

MALATYA – 2012

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEONATAL LPS UYGULAMASI ve
ÜREMENİN UZUN VADELİ
PROGRAMLANMASI: NOS ve KASPAZ-1
İNHİBİSYONLARININ ROLÜ

Tuba TAPAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat YILDIZ

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2010/138 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA – 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. M. Hanifi EMRE

İmza



Danışman

Prof. Dr. Sedat YILDIZ



Üye

Doç. Dr. Süleyman SANDAL



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2012 tarih ve 2012/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bilginin kolay, düşüncenin zor olduğunu öğreten, tez çalışmalarımı yönlendiren, akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişmeme ve gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedat YILDIZ'a,

Üzerimde emeği bulunan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. M. Hanifi EMRE, Doç. Dr. Alaadin POLAT, Doç. Dr. Halil DÜZÖVA'ya ayrıca çalışmalarımıza pratik çözüm önerileriyle katkılarda bulunan Doç. Dr. Süleyman SANDAL ve deneysel tecrübelerini paylaşarak destek olan Yrd. Doç. Dr. Ergül ALÇİN'e,

Araştırmalarımız süresince deneysel analizlerde Biyokimya Laboratuvarı'nı kullanma imkânı sağlayan Sayın Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, histolojik analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Nigar VARDI, Arş. Gör. Hülya ELBE'ye, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım Burcu KÖKSAL, Güler ORHAN, Suat TEKİN'e ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Projenin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Bu tez çalışmasında, neonatal dönemde bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit (LPS) uygulanan sıçanlarda üremenin uzun vadeli programlanması incelenmiştir. Ayrıca, LPS'nin etkisine aracılık eden nitrik oksit (NOS) inhibitörü (L-NAME) ve kaspaz-1 inhibitörü (Q-Vd-Oph), neonatal dönemde LPS ile birlikte kullanılarak bu araçların rollerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu amaçla, postnatal 7. günde dişi sıçan yavrularına salin, LPS (50 µg/kg), LPS (50 µg/kg)+ L-NAME (40 mg/kg) veya LPS (50 µg/kg)+ Q-Vd-Oph (1 mg/kg) enjeksiyonu yapılmış; prepubertal dönemde (postnatal 30. gün) de salin veya ikinci LPS enjeksiyonu (50 µg/kg) yapılarak oluşturulan stresin puberteye erişme (vajinal açılma), östrus sikluslarının düzeni (simir testi), sitokin üretimi (IL-1β, TNF-α), ovaryumda foliküler gelişme ve *E. coli*'ye spesifik anti-LPS antikorlarının üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Ortalama olarak postnatal 75. günde proöstrus fazında eter anestezisi yapılan sıçanların sağ ovaryumları ve kan numuneleri alınarak deney sonlandırılmıştır.

Puberte, iki defa LPS uygulanan grupta gecikmiş fakat NOS ve interlökin (IL)-1β inhibitörleri pubertenin gecikmesini engellemiştir. LPS enjeksiyonları primordiyal folikül rezervini azaltmış, NOS inhibitörü bu azalmayı önlerken, IL-1β inhibitörünün bu azalmaya karşı koruyucu bir rolü belirlenememiştir. İki defa LPS enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda LPS'ye karşı spesifik antikor yanıtı gözlenmiştir. Serum NO konsantrasyonları tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Serum IL-1β, tümör nekrozis faktör- alfa (TNF-α) konsantrasyonları ise tespit edilebilir düzeyin altında bulunmuştur.

Sonuçta, LPS uygulamalarının (1) puberteyi geciktirdiği, ovaryumdaki primordiyal folikül sayısını azalttığı ve kanda anti-LPS antikorlarını artırdığı tespit edilerek üremeyi uzun vadede programladığı ve (2) bu programlamada NO ve IL-1β'nin önemli rollerinin bulunduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Neonatal LPS, Puberte, Ovaryum fonksiyonu, Kaspaz-1 inhibitörü, L-NAME

ABSTRACT

NEONATAL LPS ADMINISTRATION AND LONG-TERM PROGRAMMING OF REPRODUCTION: THE ROLE OF NOS AND CASPASE-1 INHIBITIONS

In this thesis, long-term programming effect of neonatally injected bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) on reproduction was assessed in female rats. Additionally, in order to establish the roles of mediators of LPS action, inhibitors of NOS (L-NAME) and caspase-1 inhibitor (Q-Vd-OPh) were injected together with LPS. For that purpose, on postnatal day 7, female pups were injected once with either saline (control), LPS(50µg/kg), LPS(50µg/kg)+ L-NAME (40mg/kg) or LPS(50µg/kg)+ Q-Vd-OPh (1mg/kg). On postnatal day 30, these rats were either injected with saline or LPS (50 µg/kg) to observe effects of prepubertal stress on timing of puberty (as vaginal opening), estrus cyclicity (by smear test), cytokine production (e.g. IL-1 β and TNF- α), folliculogenesis and on *Escherichia coli* specific anti-LPS antibody levels. Approximately on day 75, right ovary and blood samples were taken under terminal anaesthesia and the experiment was ended.

Puberty was delayed in rats receiving double LPS injections but was not affected in those which also received NOS and IL-1 β inhibitors. Although LPS injections reduced the size of primordial follicular pool, NOS inhibitor, but not IL-1 β inhibitor, prevented this reduction. Groups receiving both LPS injections had higher anti-LPS specific antibody response. Serum NO levels were found to be similar among all groups. Serum IL-1 β and TNF- α concentrations were found to be undetectably low.

In conclusion, it has been found out (1) that LPS injections programme reproduction by delaying puberty, by reducing the number of primordial follicles in the ovary and by increasing the level of anti-LPS specific antibodies in the blood and (2) that NO and IL-1 β plays a crucial role in this programming.

Key Words: Neonatal LPS, Puberty, Ovarian function, Caspase-1 inhibitor, L-NAME

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Folikülogenez	4
2.2. Sıçanlarda Ovaryan Aktivite ve Pubertenin Başlaması.....	4
2.2.1. Östrus Siklusu.....	6
2.3. Üreme Aksını Etkileyen Faktörler	11
2.3.1. Beslenme ve Fotoperiyot.....	11
2.3.2. Stres	11
2.3.3. Enfeksiyonlar.....	12
2.4. Lipopolisakkarit Antijeni.	13
2.4.1. LPS'nin Moleküler Yapısı.....	13
2.4.2. Endotoksemi Modeli Olarak LPS.	15
2.4.3. LPS ve TLR-4 Aktivasyonu	16
2.5. LPS'nin Uzun Vadeli Etkileri	17
2.5.1. İnterlökin-1 Beta	20
2.5.2. Tümör Nekrozis Faktör Alfa	21
2.5.3. Nitrik Oksit.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Etik Kurul Onayı	24
3.2. Deney Hayvanları	24
3.3. Deney Grupları	25
3.4. Enjeksiyon Protokolü	27

3.4.1. Lipopolisakkaritin Uygulanması	27
3.4.2. L-NAME'nin Uygulanması	27
3.4.3. Q-Vd-OPh'nın Uygulanması.....	27
3.5. Vajinal Simir Yöntemi.	29
3.6. Ovaryum Histolojisi	31
3.7. Enzyme Linked Immunsorbant Assay (ELISA) Yöntemi.....	31
3.8. Serum Anti-LPS Testi	33
3.9. Serum IL-1 β Düzeylerinin Saptanması	35
3.10. Serum TNF- α Düzeylerinin Saptanması	36
3.11. Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin Saptanması	37
3.12. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Vücut Ağırlığı Değişimi	41
4.2. Puberte ve Östrus Döngüsü Bulguları	44
4.3. Ovaryum Histolojisi	47
4.4. Serum Anti-LPS testi Sonuçları	52
4.5. Serum IL-1 β , TNF- α Sonuçları	52
4.6. Serum Nitrik Oksit Sonuçları	53
4.7. Parametreler Arasındaki Korelasyonlar	54
5. TARTIŞMA	58
5.1. LPS ve Puberte	58
5.2. LPS ve Östrus Döngüsü	59
5.3. LPS ve Foliküler Gelişme	60
5.4. Anti-LPS Antikoru	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	67
EKLER	77
EK 1: Grupların östrus siklusları	77
EK 2: Etik Kurul Raporu	81
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LPS	: Lipopolisakkarit
LBP	: Lipopolisakkarit bağlayan protein
TLR-4	: Toll-like reseptör-4
MD-2	: Myeloid differentiation factor-2
CD14	: Cluster of differentiation-14
NF- κ B	: Nüklear faktör kappa beta
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa
IL	: İnterlökin
PG	: Prostaglandin
ICE	: İnterlökin-1 konvertaz enzim
PAF	: Platelet aktive edici faktör
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
L-NAME	: N-nitro-L-arginin metil ester
Nİ	: Nitrik oksit inhibitörü
Q-Vd-OPh	: Quinoline-Val-Asp(Ome)-CH ₂ -O-phenoxy
Kİ	: Kaspaz-1 inhibitörü
DMSO	: Dimetil sülfoksit
HPA	: Hipotalamik-hipofizyal-adrenal
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı faktör
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
mPOA	: Mediyal preoptik alan
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fetal ve neonatal dönemde insan ve sıçanlarda foliküler gelişim.....	5
Şekil 2.2. Östrus siklusu safhalarının dağılımı.....	6
Şekil 2.3. Östrus siklusu boyunca vajina epiteli, ovaryum ve başlıca hormonların değişimi	10
Şekil 2.4. Periferel LPS enjeksiyonu sonrası plazma kortikosteron değişimi.....	12
Şekil 2.5. Gram-negatif bakteri duvarı ve LPS'nin şematik gösterimi	14
Şekil 2.6. TLR-4/MD-2 kompleksinin yapısı.....	16
Şekil 2.7. LPS enjeksiyonu sonrası plazma IL-1 β düzeyindeki değişiklik	20
Şekil 3.1. Deneysel uygulama aşamaları.....	28
Şekil 3.2. Östrus fazlarına ait görüntüler ve karakteristik hücre tipleri.	30
Şekil 3.3. ELISA yöntemleri	32
Şekil 3.4. Anti-LPS testi protokolü	34
Şekil 4.1. Tüm grupların vücut ağırlık grafikleri	43
Şekil 4.2. Grupların puberteye ulaşma günleri	44
Şekil 4.3. Tüm grupların günlere göre puberteye ulaşma yüzdeleri.....	45
Şekil 4.4. Grupların ortalama östrus döngüsü uzunluğu	45
Şekil 4.5. Grupların östrus siklusu fazlarının yüzde değerleri	46
Şekil 4.6. Ovaryumda bulunan farklı folikül tipleri	47
Şekil 4.7. Ovaryumda bulunan en büyük antral folikülün teka interna tabakası.....	47
Şekil 4.8. Tüm grupların primordiyal folikül sayıları	48
Şekil 4.9. Tüm grupların primer folikül sayıları	49
Şekil 4.10. Tüm grupların preantral folikül sayıları.....	49
Şekil 4.11. Tüm grupların antral folikül sayıları	50
Şekil 4.12. Tüm grupların toplam folikül sayıları	50
Şekil 4.13. Tüm grupların en büyük antral folikül çapı	51
Şekil 4.14. Tüm grupların teka interna kalınlığı	51

Şekil 4.15. Grupların serum anti-LPS antikoru ELISA testinin 450 nm’de optik dansite değerleri	52
Şekil 4.16. Grupların serum nitrik oksit konsantrasyonları.....	53
Şekil 3.3. 4.17. Grupların puberteye ulaşma günü ile prepubertal (35. gün) vücut ağırlığı ilişkisi.....	55
Şekil 4.18. Grupların östrus döngüsü uzunluğu ile serum NO miktarları ilişkisi	55
Şekil 4.19. Grupların primordiyal folikül sayısı ile 69. gün vücut ağırlıkları ilişkisi.....	56
Şekil 4.20. Grupların primer folikül sayısı ile 69. gün vücut ağırlıkları ilişkisi.....	56
Şekil 4.21. Grupların teka interna kalınlığı (μm) ile % östrus ilişkisi.....	56
Şekil 4.22. Grupların ovaryan folikül sayılarının birbirleriyle ilişkileri	57
Şekil 5.1. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında sıçanlarda ovaryan foliküler gelişmenin hipotetik modeli	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Vajinal simirdeki hücre morfolojisine göre östrus siklus safhalarının sınıflandırılması.....	7
Tablo 2.2. Konuyla ilgili özet literatür bilgisi	19
Tablo 3.1. Deney grupları.....	25
Tablo 3.2. Serum IL-1 β ölçüm protokolü.....	36
Tablo 3.3. Serum TNF- α ölçüm protokolü.....	37
Tablo 3.4. Serum numunelerinin deproteinizasyon protokolü	39
Tablo 3.5. Nitrik oksit ELISA protokolü	40
Tablo 4.1. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi (g).....	42
Tablo 4.2. Tüm grupların puberteye ulaşma zamanları (gün) ve puberteye ulaştıkları vücut ağırlıkları (g).....	44
Tablo 4.3. Tüm grupların takip edilen östrus siklusu fazlarına ait yüzde değerleri ...	46
Tablo 4.4. Tüm grupların sağ ovaryumunda bulunan primordiyal, primer, preantral, antral folikül sayıları ve teka interna tabakası kalınlığı (μ m)	48
Tablo 4.5. Tüm grupların serum nitrik oksit konsantrasyonları (μ mol/L)	53
Tablo 4.6. Parametrelerin birbirleri ile ilişkisi	54

1. GİRİŞ

İnsan vücudunun yaklaşık 2 m²'si deri ile 300 m²'si mukozal yüzey ile kaplıdır. Deri ve mukozal yüzeylerde yaşayan bakteri sayısı insanın kendi hücrelerinden daha fazladır (1). İnsanın kendi hücreleriyle mikroorganizmalar arasında kurulan ilişkiler insanı mikroorganizmalara bağımlı hale getirmiştir ve bu ilişkiyi bozan faktörler doğrudan canlının yaşamını tehdit etmektedir (2).

İmmün sistem, doğumdan sonra lipopolisakkarit (LPS, gram negatif bakteri duvarı), lipoteikoid (gram pozitif bakteri duvarı) gibi moleküler yapıların büyük çoğunluğunu tanır. Bu yapılar immün hücrelerde çeşitli mekanizmaların aktive olmasında ve proinflatuvar sitokinlerin gelişmesinde anahtar rol oynamaktadır (3).

Hayatın ilk bir ayındaki sistemik, semptomatik bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar neonatal sepsis olarak adlandırılır. Neonatal sepsisten sorumlu bakteriler ülkeden ülkeye değişiklik gösterebilmektedir. Günümüzde en sık görülen ve en şiddetli sepsise neden olan *E.coli* erken başlayan sepsislerin yaklaşık % 60-80'inden sorumludur (4).

Sepsisi tetikleyen moleküllerin başında gelen gram negatif bakteri LPS'si deneysel sepsis modelinde en çok kullanılan moleküldür (5). LPS, proinflatuvar ve antiinflatuvar mediyatörler ile birlikte hücrel ve humoral immün yanıtı aktive eder. Ayrıca kompleman sistemi, akut faz proteinleri ve monosit, makrofaj, nötrofil ve doğal öldürücü hücrelerden oluşan bağışıklık sistemini harekete geçirir. Bu bağışıklık sisteminin kontrolsüz aktivasyonu, aşırı inflamatuvar yanıt aracılığı ile doku hasarına neden olabilir. Neonatal sepsisinde TNF- α salınan ilk proinflatuvar sitokin olup bunu IL-1 β ve diğer sitokinler takip ederek inflamasyonun ilerlemesinden sorumlu olurlar (4).

Literatürde sıçanların neonatal dönemde *E. coli* bakterisi ya da LPS ile oluşturulan immün aktivasyonun, yetişkinlikte stres aktivitesi artışına, davranış bozukluğuna, immün fonksiyon değişikliğine, nörolojik hastalıklara yatkınlığa,

yiyecek alımında azalmaya ve vücut ağırlık kaybına neden olduğu bildirilmektedir (6, 7, 8). Ayrıca neonatal LPS uygulaması sonucunda plazma kortikosteron seviyesinin arttığı ve yetişkinlikte hipotalamus-hipofiz adrenal (HPA) aksı aktivitesinin arttığına dair bulgular vardır (9, 10). HPA aksı aktivitesindeki bu artışın, dişi sıçanlarda gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsu frekansını baskıladığı ve östrus siklusu düzenini bozduğu görülmüştür (7, 8, 9).

LPS uygulamasına bağlı olarak üretilen proinflamatuvar sitokinlerin üreme aksını baskılamada merkezi rollerinin olduğu görülmüştür (11, 12, 13). IL-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak tanımlanan kaspaz-1 inflamasyonda ve hücre ölümünde önemli bir rol oynar. Kaspaz-1 ayrıca IL-1 β 'nın uyardığı TNF- α ve IL-6'nın üretimini dolaylı olarak etkiler. Kaspaz-1 inhibisyonu IL-1 β 'nın ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini zayıflatır (14). Literatürde neonatal LPS uygulamasıyla gelişen hafıza bozukluğunu, kaspaz-1 inhibitörünün tamamen önlediğini gösteren çalışmalar vardır (15).

LPS uygulamasına yanıt olarak gelişen oksidatif hasara katkıda bulunan diğer bir mediyatör ise NO'dur. IL-1 β , TNF- α , interferonlar ve bakteri LPS'leri gibi inflamatuvar mediyatörlerin varlığında makrofaj ve mikroglia hücrelerinde indüklenebilir NOS (iNOS) enzimi ile üretilen NO, öğrenme ve bellek, yeme-içme davranışı, madde bağımlılığı ve nörotransmitterlerin salınımı-geri alımı gibi birçok beyin işlevinde rol alır (16, 17, 18). NO oluşumu bazı nitrik oksit sentetaz (NOS) inhibitörleriyle engellenebilir. Non-selektif bir NOS inhibitörü olan N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) hem iNOS hem de nöronal NOS (nNOS) inhibitörü olarak işlev görür (19). Yapılan çalışmalar NO'nun pediatrik sepsiste önemli bir mediyatör olduğunu ve inflamasyonun derecesi ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. (4). Ayrıca erişkin dişi sıçanlarda LPS uygulamasından sonra iNOS aktivitesinin arttığı ve hipotalamik GnRH içeriğinin azaldığı görülmüştür (20).

Tüm bu literatür bilgileri göz önüne alındığında, sıçanlarda neonatal LPS uygulamasının üremeyi programlayabildiği ve bu programlamada NO'nun ve IL-1 β 'nın önemli araçlar olabileceği gözükmemektedir.

Bu çalışmada endokrin ve immünoloji arasındaki kritik ilişki üzerinden yola çıkarak NOS inhibitörü L-NAME ve yeni nesil kaspaz-1 inhibitörü quinoline-Val-Asp(Ome)-CH₂-O-phenoxy (Q-Vd-OPh)'nın, LPS'nin yıkıcı etkilerini iyileştirmedeki rolleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgularla neonatal LPS'nin n roreprod ktif, nöroendokrin, immünolojik yanıtlar üzerindeki etkileri tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Folikülogenez

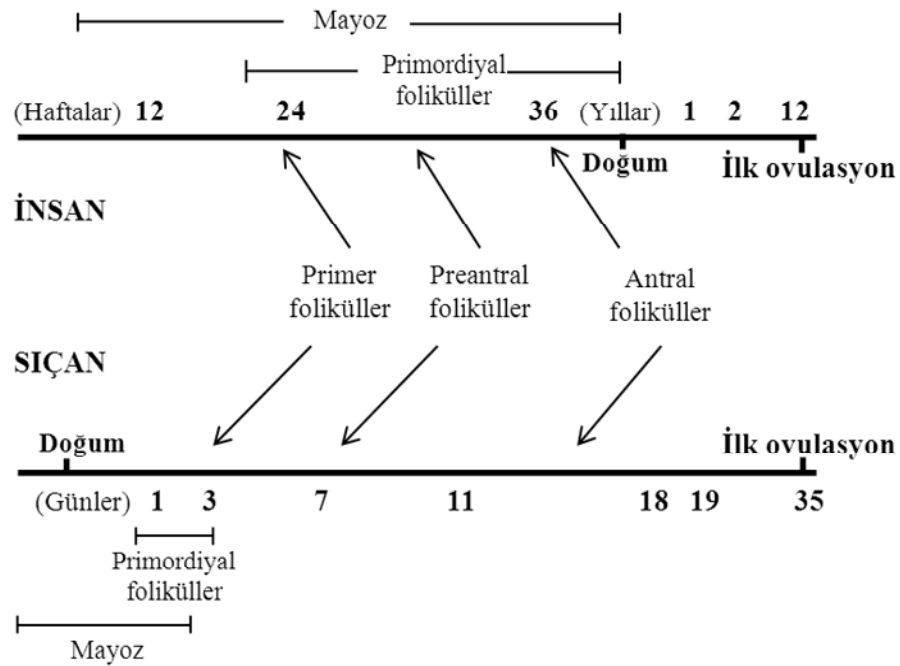
Folikülogenezis, folikülün primordiyal fazdan başlayarak morfolojik olarak belirlenen primer, preantral ve antral fazları geçerek Graaf veya preovulatuvar folikül fazıyla sonuçlanmasıdır. Ovulasyondan sonra folikül korpus luteuma dönüşür. Folikülogenezis sırasında oositler büyürken granüloza hücreleri de çoğalır ve farklılaşır. Oositin büyümesiyle beraber tek katlı yassı görünümdeki granüloza hücreleri de kübik bir şekil alacak biçimde farklılaşır ve primer folikülü oluşturur. Granüloza hücreleri oosit maturasyonu için gerekli çeşitli büyüme faktörlerini salgılamaya başlarlar. Aynı zamanda folikül çevresindeki bağ dokusu da farklılaşarak teka tabakası adını alır (21). Granüloza hücrelerinin çoğalması, foliküler bazal membranın içinde çok katlı granüloza hücreleri tarafından çevrelenmiş preantral folikülleri oluşturur. Gonadotropinler ve FSH'nın etkisi ile foliküllerin büyüme hızı artar ve granüloza hücreleri arasında boşlukların şekillendiği antral foliküllerin oluşumu gerçekleşir (21).

2.2. Sıçanlarda Ovaryan Aktivite ve Pubertenin Başlaması

Sıçanlardaki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, sıçan ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşumlarını tamamlarlar (22). İyi gelişmiş preantral foliküller yedinci günde gözlenir. İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (22). Ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (22). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Antral folikül oluştuğunda, folikülün çapı yaklaşık 200-400 μm 'ye kadar ulaşır. Granüloza hücre sayılarının oldukça arttığı ve oositin tam olarak geliştiği durumda, sıvı dolu boşluk (antrum) gözlenir ve genişlemeye başlar.

Antral aşamada çoğu folikül atreziye uğrar, çok azı ise gonadotropinlerin uyarımı ile (puberteyle birlikte) preovulatar aşamaya ulaşır. Preovulatar gonadotropin salınımına cevap olarak her siklusta dominant Graaf folikülleri fertilize olabilecek olgun oositi dışarı atar. Kalan teka ve granüloza hücreleri, korpus lutemu oluşturmak üzere değişikliğe uğrar (22).

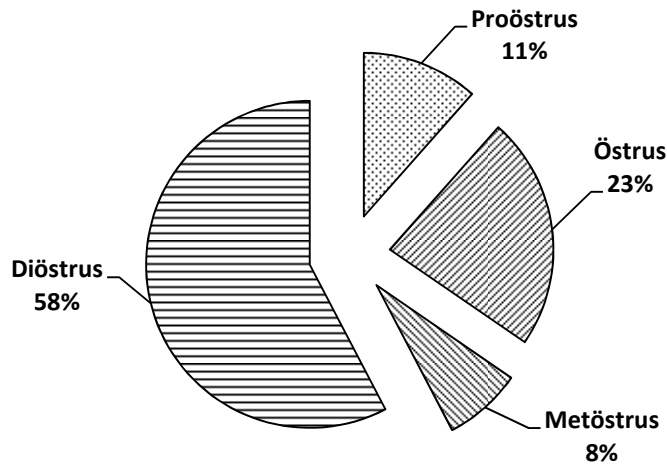
Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. 10-12. aylara kadar düzenli devam eden östrus siklusu daha sonra uzayan ve düzensiz sikluslar şeklinde devam eder. 12-15. ayların sonunda sıçanlar kalıcı siklusa girerler ve bunu kalıcı diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 μm 'den (primordiyal folikül) 500-800 μm (preovulatar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün preantral foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Preantral aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi $28 \pm 2-3$ gün olabilir (22). Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde sıçanlarda da oldukça uzundur (22).



Şekil 2.1. Fetal ve neonatal dönemde insan ve sıçanlarda foliküler gelişim (22).

2.2.1. Östrus Siklusu

Sıçanlarda östrus siklusu, proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı yaklaşık 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürer (23, 24). Siklusun düzenliliği, aydınlık-karanlık siklusunun kontrolü altındadır (25).



Şekil 2.2. Östrus siklusu safhalarının dağılımı

Östrus siklusu çalışmaları ilk olarak 1917’de Stockard ve Papanicolou tarafından başlamış olup günümüze kadar devam etmektedir (26). Vajina epiteli östrus siklusu boyunca en fazla değişikliğe uğrayan yapı olduğundan, östrus aşamalarını belirlemede vajinal simir yöntemi kullanılır (24). Bu yöntem vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatların mikroskopta incelenerek her bir fazın hücre tiplerinin histolojik olarak tanınması ile gerçekleştirilir. Vajinal simirde gözlemlenen hücre tipleri genel olarak epitel hücre, kornifiye hücre ve lökositler olarak sınıflandırılabilir. Östrus siklus aşamalarının sınıflandırılması Tablo 2.1’de belirtilen hücre tiplerine göre yapılmıştır.

Tablo 2.1. Vajinal simirdeki hücre morfolojisine göre östrus siklus safhalarının sınıflandırılması (27).

Siklus Safhası	Hücre Tipi ^a			Simir Yoğunluğu
	Lökositler	Nükleuslu Epitel	Kornifiye Epitel	
Diöstrus-Proöstrus (DP)	+/++ (Predominant)	+ İyi gelişmiş	0/+	İnce
Proöstrus (P)	0/+ Sık dejenere	+/+++ İyi gelişmiş	0/+	Orta
Proöstrus-Östrus (PE)	0	+/++	++/+++ İyi gelişmiş	Orta
Östrus (E)	0	0	++/+++ İyi gelişmiş Göreceli olarak küçük hücreler	Ortadan şiddetliye
Metöstrus (M)	0/++	0	++/+++ Östrustakinden daha geniş, daha düz ve kümelenmiş	Ortadan şiddetliye
Diöstrus 1 (D1)	++/+++	++/+++ Çoğunlukla düzensiz şekilli ve vakuollü	+/++	Ortadan şiddetliye
Diöstrus 2 (D2)	+ dan +++ ya	+ Çoğunlukla düzensiz şekilli ve vakuollü	0	İnce

^a Hücre yoğunluğu: 0=yok, +=az, +=orta yoğunlukta, +++=şiddetli.

Proöstrus fazının ilerleyen saatlerinde prolaktin, LH ve FSH artışı başlar. Östradiol seviyesi proöstrus fazında pik yapar ve östrus fazında tekrar bazal seviyeye ulaşır (25). Bu hormonal etkileşimler sonucunda proöstrus ve östrus fazında ovaryumda folikül gelişimi, östrus fazının ortalarında ovulasyon, metöstrus fazında korpus luteum oluşumu gerçekleşir. Diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır (23, 28).

Proöstrus fazında vajina epiteli dış, orta ve iç tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşur. Dış tabaka, bir miktar mukus içeren piknotik nükleuslu hücrelerden oluşur. Orta tabakada yer alan stratum granülozum östrus fazında stratum korneuma dönüşür. Üçüncü tabaka ise stratum germinativum'dur ve yaklaşık yedi hücre tabakası kalınlığındadır. Proöstrus süresince dış tabaka lümene dökülür ve simirde karakteristik nükleuslu hücreler gözlenir. İleri proöstrus ve östrus fazında ise kornifiye hücreler tabakadan ayrılır. Metöstrusun başlaması ile tüm tabaka dökülür, simirde kornifiye hücre miktarı artar. Diöstrusta nükleuslu hücre miktarının artması, dökülme işleminin sonlandığını gösterir. Stratum germinativumun birkaç süperfisyal tabakasında ise şiddetli lökosit infiltrasyonu gözlenir. Diöstrusun ilerleyen aşamalarında stratum germinativumda aktif gelişim süreci başlarken proöstrus ile birlikte stratum granülozum yüzeyin altında hücre tabakalarında artış başlar ve siklus tamamlanır (24, 29). Östrus siklusu boyunca başlıca steroid, ovaryum ve vajina epitelinde ortaya çıkan değişimler Şekil 2.3'te sunulmuştur.

Proöstrus başlangıcında, vajinal sitolojide en baskın hücre tipi intermediyer hücrelerdir, süperfisyal ve parabazal hücreler az sayıdadır. Kornifiye epitel hücreleri ender olarak görülür. Süperfisyal hücreler, dönemin sonunda baskın görünüme ulaşacak olan kornifiye hücrelerle yer değiştirene kadar artar. Geç proöstrusta simirde karyopiknotik ve kornifiye hücreler baskındır (30).

Östrus başlangıcında simirde kornifiye olmuş hücreler artış gösterir. Lökositler bu dönemde görülebilir. Artan östrojen düzeyine karşı oluşan cevap, kornifiye hücrelerin sayısında artış biçiminde kendini gösterdiğinden, bu dönemde süperfisyal hücrelerin diğer epitel hücrelere oranı saptanabilir. Östrojenin etkisinde intermediyer hücreler prekornifikasyona uğrar; bu durumda süperfisyal hücre karakteri, sitoplazmanın eozinofilik hale gelmesi ve nükleusun büzülmesi ile kendini

belli eder. Dönemin ortalarında, %75 oranında çekirdekli, %25 oranında ise kornifiye hücre bulunur (31).

Metöstrusta simirde büyük düz çekirdekli hücrelerin tekrar ortaya çıkışı görülür. Östrusta vajinal epitelin süperfisyal tabakasında kornifiye hücreler bulunurken, bunların dökülmesi ile metöstrusta lökositlerin yayılımı görülür. Tüm kornifiye hücreler döküldükçe, derin tabakalardan gelen epitel hücreler görülür ve polimorf nükleer lökositler simirde fark edilir. Ovaryum steroidlerinin oluşturduğu etkinin hızla düşmesi sonucunda simir tipik olarak atrofik hale gelir, epitel hücre popülasyonu parabazal tipe dönüşür ve zeminde değişken miktarda mukus meydana gelir (32, 33).

2.3. Üreme Aksını Etkileyen Faktörler

Pubertal gelişim hipotalamik GnRH salınımının artmasıyla hipotalamik-hipofizyal-gonadal aksın gelişmesine bağlıdır (35). Üreme sisteminin hormonal kontrolünde esas rolü olan GnRH, hipotalamusun arkuat nukleusundan pulsatil olarak salgılanır ve ön hipofizden LH, FSH sentezini uyarır. LH ve FSH, gonadlardan steroid sentezi ve gametogenezi düzenleyerek üreme fonksiyonunda rol alır. Puberte zamanı beslenme, fotoperiyot, stres ve enfeksiyon gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir (35). Proinflatuvar sitokinler, prostaglandinler, ağır hastalıklar ya da endotoksin gibi çeşitli uyaranlar immün stres oluşturarak üreme fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir (36).

2.3.1. Beslenme ve Fotoperiyot

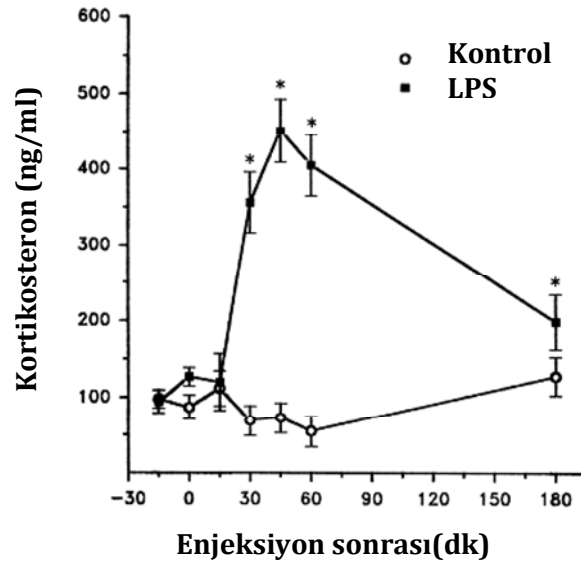
İyi beslenen ve az sayıda kardeşi olan yavru sıçanlar puberteye daha erken girerler. Birçok rodent türü üreme aktivitesinde besinsel şartlara bağlı adaptasyon geliştirir. Bu fizyolojik adaptasyonlar hayatta kalma ve neslin devamı için önemli bir stratejidir (37). Sıçanlarda uygulanan ışık süresinin östrus siklusu uzunluğu üzerine doğrudan etkisi vardır. Aydınlık/karanlık süresi 12:12 olan sıçanlarda östrus süresi 4 gün iken, 16:8 saat olan hayvanlarda östrus süresi 5 gündür. Hayvanlar gün içerisinde 22 saat süreyle ışığa maruz bırakıldıklarında ise östrus siklusunun düzensizleştiği ve hayvanların üreyemedikleri görülmüştür (38).

2.3.2. Stres

HPA aksın önemli unsuru olan kortikotropin salgılatıcı hormon (CRF), GnRH pulsunun baskılanmasında çok önemli bir rol oynar (35). Peripubertal dişi sıçanların, CRF reseptör antagonistinin icv uygulanması sonucunda puberteye erken ulaştıkları görülmüştür (35). HPA aksı aktivitesinin artışı immün aktivasyon, nörolojik ve endokrin fonksiyonlarda kalıcı değişikliğe yol açar (39).

2.3.3. Enfeksiyonlar

Bakteriyel enfeksiyonlar organizmanın immün sisteminde güçlü bir yanıtı neden olarak inflamatuvar stres oluşturur. İmmünolojik uyaranların üreme fonksiyonlarını etkileme yolu tam olarak anlaşılamamış olup, endokrin, parakrin ve nöronal sistemler yoluyla olabileceği düşünülmektedir (40). İmmün sistemi uyarmada en çok kullanılan deneysel model olan LPS uygulaması sonucunda en çok saptanan iki sitokin TNF- α ve IL-1 β 'dir (41). LPS'lerin neden olduğu immünitide nötrofil ve makrofajlar gibi klasik immün hücrelerin yanında endometriyal ve ovaryum hücreleri de rol alarak doğrudan sitokin ve kemokin salınımını artırmaktadır (42). İnflamatuvar ajanlar ovaryan siklusu bozulmasına yol açarak üremeyi etkileyebilmektedir (43). Ayrıca Sheldon ve arkadaşları LPS'nin neden olduğu uterus inflamasyonunda granüloza hücrelerinde LPS'nin özgül reseptörü olan toll-like reseptör-4 (TLR-4) ekspresyonunun arttığını ve buna bağlı olarak östradiol salınımını azaldığını tespit etmişlerdir (42). Bakteriyel endotoksin olan LPS'nin periferal uygulanmasından sonra plazma kortikosteron değişimi Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



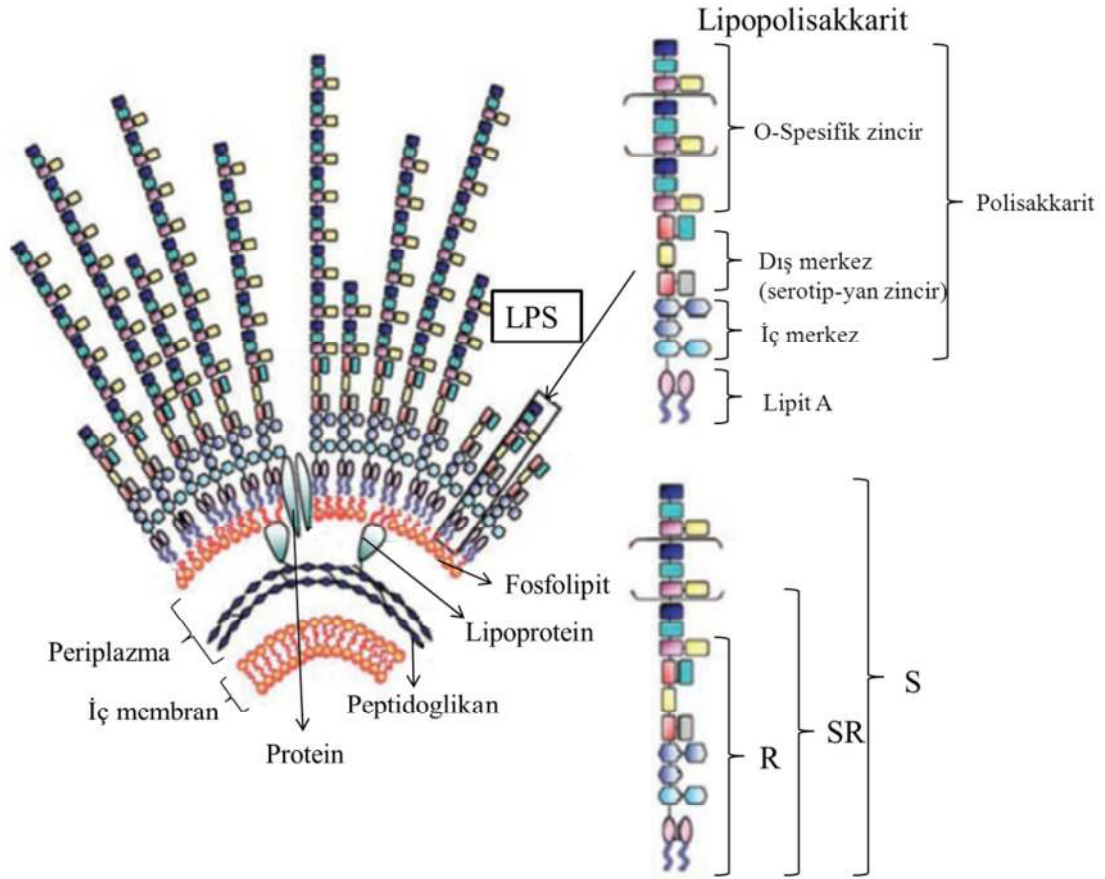
Şekil 2.4. Periferal LPS enjeksiyonu sonrası plazma kortikosteron değişimi (44).

2.4. Lipopolisakkarit Antijeni

Bakteriyel endotoksin LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen, hayvanlarda deneysel septik şok modellerinde kullanılan, glikolipid yapıdaki maddeler grubudur. Günümüzde yapısı ve katıldığı biyolojik mekanizmalar çok iyi tanımlanmış olan LPS, gram negatif bakteri öldüğü veya bölündüğü sırada açığa çıkmaktadır (45). *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok gram-negatif bakteriden elde edilmesine rağmen deneysel septik şok çalışmaları *E. coli*'den elde edilen LPS'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu grupta O26:B6, O55:B5, O111:B4 gibi farklı serotiplere sahip farklı suşlardan elde edilmiş LPS türleri mevcuttur (46).

2.4.1. LPS'nin Moleküler Yapısı

LPS'nin yapısı esas olarak 3 immünokimyasal bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Bunlar biyolojik olarak etkinlik gösteren lipit A, O-polisakkarit zinciri (O-spesifik zincir) ve yan zincir (R-kor oligosakkarit)'dir. O-polisakkarit molekülün dış yüzeyinde bulunur ve tek başına inflamatuvar bir reaksiyon oluşturmaz. O-polisakkarit zinciri genellikle tekrarlayan oligosakkarit ünite polimerlerinden meydana gelir. Bu yapı LPS'de her serotip için farklı antijenik özellik taşır ve endotoksine serotip denilen bakteriyel köken ve karakteristik özellikleri verir (47). R-kor oligosakkariti ise benzer bakteriler arasında aynı yapıyı gösterir. LPS'nin neden olduğu inflamatuvar ve hemodinamik değişikliklerden esas sorumlu olan yapı olan lipit A tüm serotipler için aynı özelliğe sahip lipit komponentidir. Literatürde LPS ve endotoksin aynı anlamda kullanılsa da aralarında fark vardır. LPS saflaştırılmış glikolipid yapıya sahiptir. Endotoksin ise LPS'ye ek olarak az miktarda hücre duvarı proteinleri, lipitler, lipoproteinler ve polisakkarit içerir (46).



Şekil 2.5. Gram-negatif bakteri duvarı ve LPS'nin şematik gösterimi. R, SR ve S sırasıyla rough tip, semi-rough tip ve smooth-tipin yapısını göstermektedir (48).

LPS, bağışıklık sisteminin inflamatuvar yanıtını uyarak sepsise neden olur. Sepsis, bilimdeki ilerlemelere rağmen halen yüksek ölüm oranları ile sonuçlanmaktadır. Ölüm oranı %8-%90 arasında değişmekte ve ortalama %35 olarak bildirilmektedir. ABD'de ölüm sebepleri arasında 13. sırada gelen sepsis, yoğun bakım ünitelerinde en sık ölüm nedenlerindendir. Toplumda gelişen sepsis olgularında en sık etkenler *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'tur. Hastane içinde gelişen sepsis olgularında görülen mikroorganizmalar arasında gram negatif mikroorganizmalar halen birinci sırada gelmektedir (49).

LPS'nin septik süreci başlatabilmesi için karaciğerde sentezlenen molekül ağırlığı 58 kDa lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP) ile birleşerek monosit, makrofaj ve lenfosit gibi hücrelerin yüzeyinde lokalize olan molekül ağırlığı 53 kDa

CD14 molekülü ve TLR-4 ile bağlanması gerekir. Bu bağlanma neticesinde, hücre içinde nükleustaki hücresel sinyal mekanizması nükleer faktör kappa beta (NF- κ B)'nin aktivasyonunu sonucu TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8 ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokinler üretilir (50). Bu sitokinler NO, prostaglandin (PG), kemokin gibi mediyatörlerin salınımına neden olarak gram (-) bakterilerin neden olduğu öldürücü etkiye katkıda bulunur (51).

Endotoksinin etki ettiği en önemli hücresel immün sistemi oluşturan hücreler;

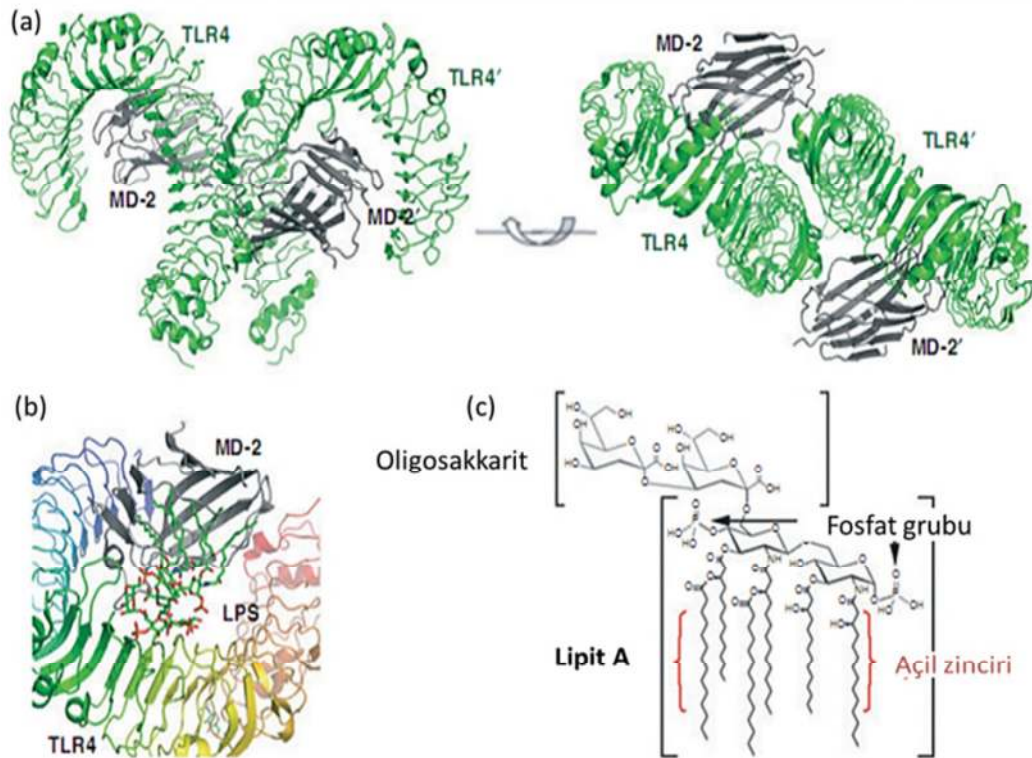
1. Monosit ve doku makrofajları: LPS'nin etkisi sonucu monosit-makrofaj sisteminden TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, NO salgılanır. Ayrıca PG, serbest oksijen radikallerinin ve platelet aktive edici faktörün salgılanmasından da sorumludur (52).
2. Mikroglialar: Periferel olarak uygulanan LPS, merkezi sinir sisteminde TLR-4'ün ekspresyonuna ve kronik proinflatuvar yanıt sonucunda inflamasyona neden olur (50).
3. Vasküler endotelial hücreler ve düz kas hücreleri: LPS'nin etkisiyle endotel hücrelerden IL-1 β , IL-8 ve IL-6 salınımı gerçekleşir (53).
4. Endometriyal hücreler: LPS'lerin neden olduğu immün yanıtta endometriyal hücreler doğrudan sitokin ve kemokin salınımını artırırlar (42).

2.4.2. Endotoksemi Modeli Olarak LPS

LPS'nin stabil ve saf bir bileşik olması, kullanılabilecek kadar liyofilize formda depo edilebilmesi deneysel model oluşturmaya kolaylaştırdığından dolayı en çok kullanılan modeldir (5). LPS genelde liyofilize toz halinde ticari olarak temin edilir. Liyofilizasyon işlemi fenol ekstraksiyonu, triklorasetik asit ekstraksiyonu, jel filtrasyonu gibi farklı kimyasal işlemler uygulanarak üretici firmalar tarafından yapılır (46). LPS ile septik şokta metabolik, immünolojik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar yapılmaktadır. Toz halindeki LPS deneysel çalışma protokollerine göre suda çözünerek deney hayvanlarına periton veya damar içine tek doz veya infüzyon şeklinde verilir. Endotoksemi modelinde enjekte edilen LPS'nin nanogram düzeyindeki miktarı bile hayvanlarda deneysel septik şok oluşturabilmektedir (54).

2.4.3. LPS ve TLR-4 Aktivasyonu

İlk olarak 1991 yılında *Drosophila melanogaster* adlı meyve sineğinde keşfedilen ve immün sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğu keşfedilen reseptöre “Toll geni”ne olan benzerliğinden dolayı “Toll-like” adı verilmiştir (55). İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan Toll-like reseptörlerden olan TLR-4, lipopolisakkaritlerin tanınmasında rol almaktadır. TLR-4’ün bir LPS reseptörü olduğu anlaşılmış olup bu reseptörün fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD-2 (myeloid differentiation factor-2) ve LBP içeren bir molekül kompleksini oluşturduğu, bu moleküllerden herhangi birinin eksik olduğu farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmiştir (56).



Şekil 2.6. TLR-4/MD-2 kompleksinin yapısı (50).

- TLR-4/MD-2 kompleksinin yandan ve üstten görünümü,
- TLR-4/MD-2 arabiriminde LPS bağlayıcı yerin yakından görünümü,
- LPS'nin moleküler yapısı.

TLR-4, liganda bağlanınca aktive olur ve hücre içi kısmı aracılığı ile NF- κ B ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF- κ B; TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konağın doğal immün cevabıdır (57, 58, 59). TLR ilişkili NF- κ B aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın mikroplara karşı savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetiklerler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir (60).

2.5. LPS'nin Uzun Vadeli Etkileri

Hayatta erken stresin uzun vadeli sonuçlar doğurduğu biliniyor. Birçok çalışma neonatal dönemde sıçanlara immünolojik strese yol açan LPS enjeksiyonunun doğal immün yanıtı programlayabildiğini öne sürmektedir.

Neonatal dönemde LPS'ye maruz kalmak ileriki yaşamda anksiyeteye ilişkili davranışlara yatkınlığı arttırmaktadır (41). Bu etkide beyin IL-1 β ve TNF- α artışının önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Buna göre erken bakteriyel toksin, yetişkinlikte akut stresle karşı karşıya kalındığında nöroendokrin yollarla etkisini sürdürebilmektedir (41).

Neonatal endotoksin henüz olgunlaşmamış sıçan beyinde IL-1 β ekspersyonu sonucu glial apoptozise neden olur. Özellikle korteks ve hipokampüste önemli hasarlar oluşturarak bu bölgelerde demiyelizasyona ve kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olur (15). Bu süreç beyin bölgeleri arasındaki iletişimi negatif yönde etkiler. Neonatal endotoksin maruziyetinin yetişkinlikte şizofren, otizm ve diğer nörolojik hastalıkların gelişme olasılığını arttırdığı görülmüştür (61).

Yetişkin sıçanlarda periferik LPS uygulaması, hipotalamusta GnRH perikaryalarınca zengin bir bölge olan mediyal preoptik alan (mPOA)'da IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunu arttırarak GnRH salınımını baskılamıştır (62). Hem neonatal hem de yetişkin dönemde LPS enjeksiyonu yapılan sıçanlarda hipotalamik CRF ekspresyonunun arttığı ve LH salınımının azaldığı görülmüştür (8). Yine neonatal ve yetişkinlik döneminde LPS enjeksiyonu, hipotalamustan IL-1 β ve TNF- α artışına,

GnRH ve LH salınımında azalmaya ve serum testosteron seviyesinin azalmasına yol açmıştır (63).

Puberteye ulaşmada önemli katkıları olan hipotalamik kisspeptin ekspresyonunun neonatal LPS enjeksiyonu etkisiyle azaldığı ve pubertenin geciktiği bildirilmiştir (64). Yine neonatal dönemde tek LPS enjeksiyonu sıçanlarda puberte gecikmesine, östrus siklus düzeninin bozulmasına ve ovaryum foliküllerinde azalmaya yol açmıştır (65). Konuya ilişkin özet literatür bilgisi Tablo 2.2’de sunulmuştur.

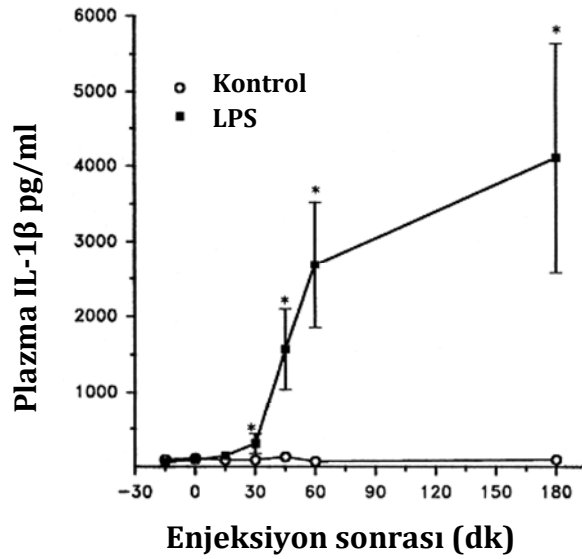
Tablo 2.2. Konuyla ilgili özet literatür bilgisi (7, 8, 9, 10, 15, 41, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69).

Yazar	Yıl	Enjeksiyon	Dozu/yolu	Hayvan Türü	Araştırma Bulguları
Shanks ve ark.	(1995)	<i>S. enteritidis</i>	ip. 50 µg/kg	Neonatal Long-Evans sıçan	ACTH, CRH, Kortikosteron ↑
Turnbull ve ark.	(1997)	IL-1 β	İcv	Yetişkin Sprague Dawley	hCG'ye karşı Testesteron yanıtı ↓
Shanks ve ark.	(2000)	<i>S. enteritidis</i>	ip. 50 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Kortikosteron, CRH ↑
Sergeyev ve ark.	(2001)	<i>S. abortus equi</i>	ip. 125 µg/kg	Yetişkin Sprague Dawley	Açlık-tokluk merkezi bozulur, iştah azalır
Watanobe ve ark.	(2003)	<i>E. coli</i> O127:B8	iv. 100 µg/kg	Yetişkin, Wistar albino	LH ↓ ve GnRH ↓, IL-1 β ↑, TNF-α ↑ @ mPOA
Walker ve ark.	(2004)	<i>S. enteritidis</i>	ip. 50 µg/kg	Neonatal Fischer 344	Kortikosteron ↑, Yetişkinlikte anksiyete ↑
Bilbo ve ark.	(2005)	<i>E. coli</i>	ip. 25 µg/kg	Yetişkin Sprague Dawley	IL-1 β ↑, yetişkinlikte mikrogliya ↑, kortikosteron ↑ Kaspaz-1 inh; IL-1 β →, hafıza alanı hasarı önleni
Li ve ark.	(2007)	<i>E. coli</i> O55:B5	ip. 50 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Tekrarlanan LPS uygulamasında LH ↓, CRF reseptörü ↑
Kohman ve ark.	(2008)	<i>E. coli</i> O111:B4	ip. 150- 250 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Yetişkinlikte davranış ve öğrenme bozukluğu gelişir
Walker ve ark.	(2009)	<i>S. enterica</i>	ip. 50 µg/kg	Neonatal Wistar albino	Yetişkinlikte anksiyete ilişkili davranış artar
Knox ve ark.	(2009)	<i>E. coli</i> O55:B5	ip. 50 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Neonatal LPS enjeksiyonunda hipotalamik kisspeptin ekspresyonu ↓ ve puberte gecikir
Iwasa ve ark.	(2009)	LPS	ip. 100 µg/kg	Yetişkin Sprague Dawley	GnRH, Testesteron, LH ↓, IL-1 β, TNF-α ↑
Iwasa ve ark.	(2009)	LPS	ip. 100 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Yiyecek alımı, vücut ağırlığı ↓, Östrus siklusu uzar, hipotalamik UCR, CRH ve reseptörleri ↑
Wu ve ark.	(2011)	<i>E. coli</i> O55:B5	ip. 50 µg/kg	Neonatal Sprague Dawley	Puberte gecikir, östrus siklusu düzeni bozulur, yetişkinlikte ovaryum ağırlığı ve folikül sayısı ↓
Walker ve ark.	(2011)	<i>S. enteritidis</i>	ip. 50 µg/kg	Neonatal Wistar albino	Kortikosteron ↑, Testesteron, LH ↓, sperm ↓, Normal vücut ağırlığı/puberte zamanı bozuldu

2.5.1. İnterlökin-1 Beta

Makrofajlar, lenfositler, nötrofiller, mikroglialar, dendritik hücreler ve endotel hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınan 18 kDa ağırlığında bir sitokin olan IL-1 β , aktif olmayan pro-peptit formdan sistein proteaz kaspaz-1 tarafından aktif hale gelir (70, 71). Kaspaz-1 aktivasyonu inflamasyon sinyalleri tarafından uyarılır. Sonuçta sepsisin ortaya çıkması durumunda hem pro-IL-1 β hem de gen transkripsiyon seviyesi düzenlenir (72).

Deneysel endotokseminde birçok sitokin serum düzeyinde geçici bir artış şekillendiği ve septik şokun gelişiminde bu proteinlerin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (73). LPS infüzyonunu izleyen 180. dakikada IL-1 β düzeyi artarak pik yapmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. LPS enjeksiyonu sonrası plazma IL-1 β düzeyindeki değişiklikler (44).

IL-1 β , immün sistem ve nöroendokrin sistem arasında çok yönlü bağlantısı olan güçlü ve etkili bir aracı moleküldür (74). Birçok çalışmaya göre özellikle IL-1 β , GnRH salınımını bloke ederek LH salınımını baskılar (75). Son zamanlarda IL-1 β 'nın, GnRH mRNA üretimini inhibe ederek GnRH nöronlarının aktivitesini baskılayabildiği görülmektedir (76). Ayrıca sistemik LPS enjeksiyonu ya da IL-1 β 'nın GnRH

nöronlarının çoğunlukla lokalize olduğu mPOA'ya infüzyon sonucunda LH amplitüt ve frekansının en aşağı seviyelere indiği görülmüştür (62).

IL-1 β 'nın nöronal hasardaki rolleri de önem arz etmektedir. Periferik *E.coli* enjeksiyonunda, hipokampüste mikrogial hücrelerde IL-1 β artışı görülür. Hipokampüste ve pariyetal kortekste IL-1 β artışı kaspaz-1 inhibisyonu ile tamamen önlenerek, gelişen hafıza bozukluğunun önüne geçilebildiği bildirilmiştir (15).

Üçüncü jenerasyon kaspaz inhibitörü olan Q-Vd-Oph, apoptozisi önlemede yaygın olarak kullanılan benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (zVAD-Fmk)'dan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Q-Vd-Oph ayrıca kaspaz 2 ve 9'un bloklanmasını da sağlamıştır (77). Bakteri veya endotoksin infüzyonundan sonra dolaşımda belirlenen ilk sitokinlerden birinin de TNF- α olması ve bunun da inflamasyonda önemli rol alması nöronal programlamada rolünün olduğu kanısını uyandırmıştır.

2.5.2. Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TNF- α , 17 kDa moleküler ağırlıkta güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. TNF- α 'nın başlıca hücrel kaynağı monositler ve doku makrofajları olmasına rağmen bu sitokin nötrofil, dendritik hücreler, endotelial hücreler gibi birçok hücre tipi tarafından da sentezlenebilmektedir (78).

TNF- α 'nın knock out edildiği farelerde *E.coli* endotoksininin neden olduğu ölümcül etkide azalma görülmesi, bu sitokinin bakteri türüne özgü bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (51).

TNF- α 'nın doğrudan mPOA'ya infüzyonu sonucu LH salınımı baskılanmıştır. Ayrıca TNF- α 'nın, GnRH ile uyarılan LH salınımını azalttığı biliniyor (79). *E.coli* ya da LPS enjeksiyonuyla inflamatuvar yanıtı karşı endometrial hücrelerde TNF- α , NOS ve PG ekspresyonunda artış görülmektedir (80).

2.5.3. Nitrik Oksit

NO, 30 kDa molekül ağırlığında biyolojik membranları kolayca geçebilen ve yağda çözünürlüğü yüksek olan gaz yapısında bir moleküldür (81). NO, plazma membranını serbestçe geçtikten sonra reseptörüyle birleşmeden doğrudan veya guanilat siklaz aktivasyonu ile siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu hızlandırır ve birçok olayın aktivasyonuna katkı sağlar (82).

NO, dioksjenaz enzimi aracılığıyla L-arjinin'den katalizlenerek NOS ile üretilir. NOS'un, nöronal (nNOS), uyarılabilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) olarak üç izoformu tanımlanmıştır. eNOS, düz kas ve kalp kasında, kadın ve erkek üreme yollarında ve beyinde bulunurken, nNOS beyin, spinal kord, parasempatik gangliyonlar, mide epitel hücreleri, pankreas, akciğer, uterus, periferik sinirler ve iskelet kasından salgınır (83). iNOS ise immünolojik, inflamatuvar olaylarda rol alır ve hücre aracılı immün cevapta etkilidir (84). LPS ve proinflamatuvar sitokinler iNOS'u indükleyerek makrofajlar, nötrofiller, hepatositler, endotel hücreleri ve kan beyin bariyeri gibi birçok hücreden sitotoksik özellikleri olan NO üretimine neden olurlar (81). NO ayrıca merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumunun dahil olduğu birçok fonksiyonda rol alan bir nöromediyatördür. Merkezi sinir sisteminde, glutamatin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini uyarması sonucunda sentezlenir. Septik süreçte ortaya çıkan aşırı miktarda glutamatin NMDA reseptörlerini uyarmasıyla aşırı miktarda NO salgınır ve NO'nun nöronlar üzerinde nörotoksik etkisine neden olur (85).

iNOS mutantlı farelerin, LPS'nin yol açtığı septik şoka karşı dirençlerinin artması NO'nun sepsiste kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (86). NO'nun oluşumunu engellemede en sık ve en gelişmiş model olarak L-arginin analogları ile NOS substratlarının inhibisyonu kullanılmaktadır. Bunlardan spesifik olmayan L-NAME en çok kullanılan ve etkili olan inhibitördür (87). LPS'ye bağlı hepatotoksisite, barsak doku hasarı ve damar geçirgenliği NO inhibitörleri ile baskılanmış ve NO analogu ile patolojik hasar geri döndürülmüştür (88). Yine deneysel osteoartrite karşı özgül olmayan NO inhibitörü L-NAME'nin intraartiküler uygulanması, sıcaklık hiperaljezisini önlemiş ve eklemde daha fazla şişmesi engellenmiştir (89).

NO, biyolojik sistemlerde üretildikten çok kısa bir süre içerisinde nitrite ve ardından nitrate dönüşür. Günümüzde örneklerdeki nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3)

miktarları iki aşamalı bir yöntem ile ölçülmekte olup, öncelikle nitrat enzimatik dönüşüm veya metalik kadmiyum ile nitrite indirgenmesi esasına dayanır. Nitrit ölçümü için 50'den fazla kolorimetrik yöntem kullanılmış, bu yöntemlerden çoğu azo boyalarının oluşumu temeline dayanmaktadır. Nitrit ölçüm yöntemlerinden biri olan Griess yöntemi hemen hemen her örnekte kullanılabilecek bir yöntemdir. Griess yönteminin duyarlılık limitinin 0,1-1 μ M kadar olduğu bildirilmiştir (90).

Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır (Griess reaksiyonu). Griess reaksiyonu ortamdaki nitrit ve nitrat iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanımaktadır (90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındıktan sonra İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜ-DEHÜM)'de yapılmıştır (Etik kurul raporu için bkz. Ek.2).

3.2. Deney Hayvanları

Çalışmada İNÜ-DEHÜM'de üretilen 7 aylık 12 adet dişi Wistar albino sıçan anaç olarak kullanıldı. Sıçanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık, 22±2 °C sıcaklık koşulları altında kontrol altına alındı ve *ad libitum* olarak beslendi.

Gebeliği sağlamak üzere 3 dişi ile 1 erkek sıçan aynı kafese bırakıldı. Ertesi gün dişi sıçanlardan vajinal simir alınarak spermatozit gözlenen preperatlar pozitif kabul edildi ve gebeliğin 0. günü olarak kaydedildi. Gebeliğin 20. gününde sıçanlar bireysel kafeslere ayrıldı. Doğumun gerçekleştiği günden sonraki 7. ve 30. günlerde enjeksiyon prosedürü uygulandı.

3.3. Deney Grupları

Çalışmanın amacına uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi her grupta 5-9 adet yeni doğan dişi sıçan olmak üzere 8 deney grubu oluşturuldu:

Tablo 3.1. Deney grupları.

GRUPLAR	n	Neonatal 7. gün	Prepubertal 30. gün
Grup 1	7	Salin	Salin
Grup 2	7	Salin	LPS
Grup 3	9	LPS	Salin
Grup 4	5	LPS	LPS
Grup 5	6	LPS+Nİ	Salin
Grup 6	5	LPS+Nİ	LPS
Grup 7	7	LPS+Kİ	Salin
Grup 8	5	LPS+Kİ	LPS

Grup 1, Salin+Salin; postnatal 7. günde ve prepubertal 30. günde 0,05 ml steril serum fizyolojik (SF) ip yolla enjekte edildi.

Grup 2, Salin+LPS; postnatal 7. günde 0,05 ml steril SF, Prepubertal 30. günde 50 µg/kg LPS (*E. coli* serotip O111:B4) ip yolla enjekte edildi.

Grup 3, LPS+Salin; postnatal 7. günde 50 µg/kg LPS 0,05 ml steril SF içinde çözülerek ip yolla enjekte edildi (8). Bu dozun HPA aktivasyonunu kalıcı olarak uyardığı bilinmektedir (10). Prepubertal 30. günde 0,05 ml steril SF ip yolla enjekte edildi.

Grup 4, LPS+LPS; postnatal 7. günde ve prepubertal 30. günde 50 µg/kg LPS ip yolla enjekte edildi.

Grup 5, Nİ(LPS)+Salin; postnatal 7. günde 50 µg/kg LPS enjeksiyonundan 30 dk. önce 40 mg/kg L-NAME ip olarak uygulandı. Nİ'nin bu dozunun sıçanlarda damar tonusunda en yüksek etki gösteren dozu olduğu biliniyor (91). Prepubertal 30. günde 0,05 ml steril SF ip yolla enjekte edildi.

Grup 6, Nİ(LPS)+LPS; postnatal 7. günde 50 µg/kg LPS enjeksiyonundan 30 dk. önce 40 mg/kg L-NAME ip olarak uygulandı. Prepubertal 30. günde 50 µg/kg LPS ip yolla enjekte edildi.

Grup 7, Kİ(LPS)+Salin; postnatal 7. günde 50 µg/kg LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra Q-Vd-OPh 1 mg/kg ip olarak uygulandı (92). Prepubertal 30. günde 0,05 ml steril SF ip yolla enjekte edildi.

Grup 8, Kİ(LPS)+LPS; postnatal 7. günde 50 µg/kg LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra Q-Vd-OPh 1 mg/kg ip olarak uygulandı. Prepubertal 30. günde 50 µg/kg LPS ip yolla enjekte edildi.

Tüm gruptaki hayvanlar 25. günde sütten kesilerek dişi ve erkek sıçanlar farklı kafeslere ayrıldı. Üreme aksında gözlemlenecek etkinin gücünü arttırmak için 18-42. günler arasında 8 saat ışık-16 saat karanlık uygulaması yapıldı. Postnatal 30. günden itibaren vajinal açıklık takip edilmeye başlandı ve puberteye ulaşma zamanları kaydedildi. Vajinal açıklık oluşur oluşmaz vajinal simir ile östrus siklusu takip edildi. Postnatal 70 güne kadar östrus fazı göstermeyen sıçanlar değerlendirmeye alınmadı. Tüm gruptaki hayvanların belirli aralıklarda vücut ağırlıkları kaydedildi. Tüm grupların üreme parametreleri olan puberte ve östrus döngüleri takip edildikten sonra proöstrus fazlarında (ortalama 75. günde) sağ ovaryum dokuları ve kan örnekleri alınarak deney sonlandırıldı.

3.4. Enjeksiyon Protokolü

3.4.1. Lipopolisakkaritin Uygulanması

LPS, (*E. coli* serotype 0111:B4, Sigma L-2630), 0,05 ml hacimde 50 µg/kg dozunda olacak şekilde SF ile hazırlandı. LPS uygulanan deney gruplarına insülin enjektörü ile ip olarak uygulandı.

3.4.2. L-NAME'nin Uygulanması

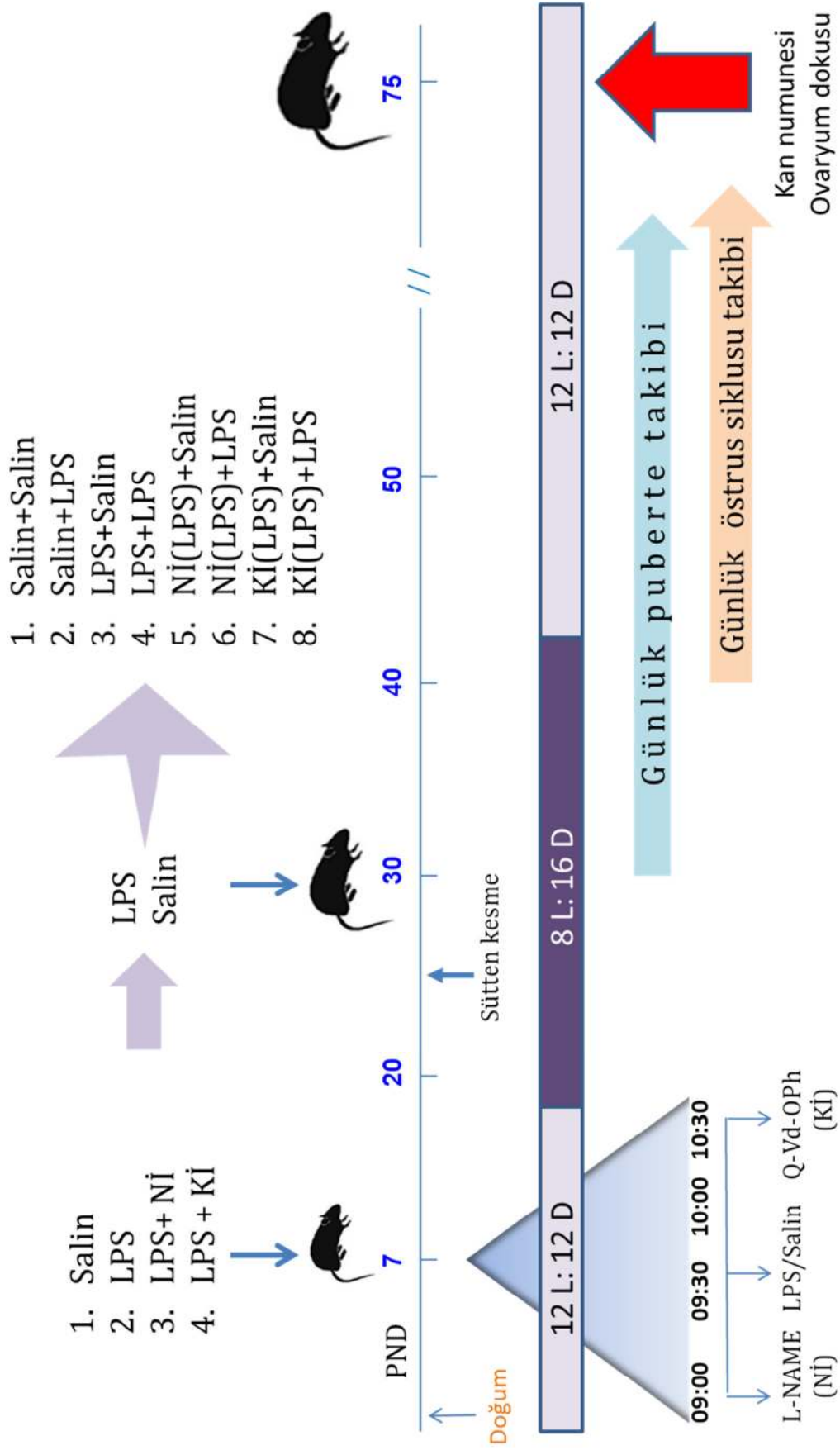
L-NAME (Sigma N-5751) çözeltisi 0,05 ml hacimde 40 mg/kg doz olacak şekilde SF ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti L-NAME uygulanan deney grubuna (LPS+L-NAME) LPS enjeksiyonundan 30 dakika önce insülin enjektörü ile ip olarak uygulandı.

3.4.3. Q-Vd-Oph'nın Uygulanması

Çalışmada kullanılan 1 mg Q-Vd-Oph (Biovision), 200 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözüldükten sonra SF ile 5 ml'ye tamamlandı (%4'lük DMSO solüsyonunda 1 mg Q-Vd-Oph çözüldü).

Q-Vd-Oph çözeltisi, Q-Vd-Oph uygulanacak olan deney grubuna LPS enjeksiyonu yapıldıktan 1 saat sonra 0,05 ml hacimde 1 mg/kg doz olacak şekilde insülin enjektörü ile ip olarak uygulandı.

Deneysel uygulama aşamaları Şekil 3.1'de şematize edilerek sunulmuştur.



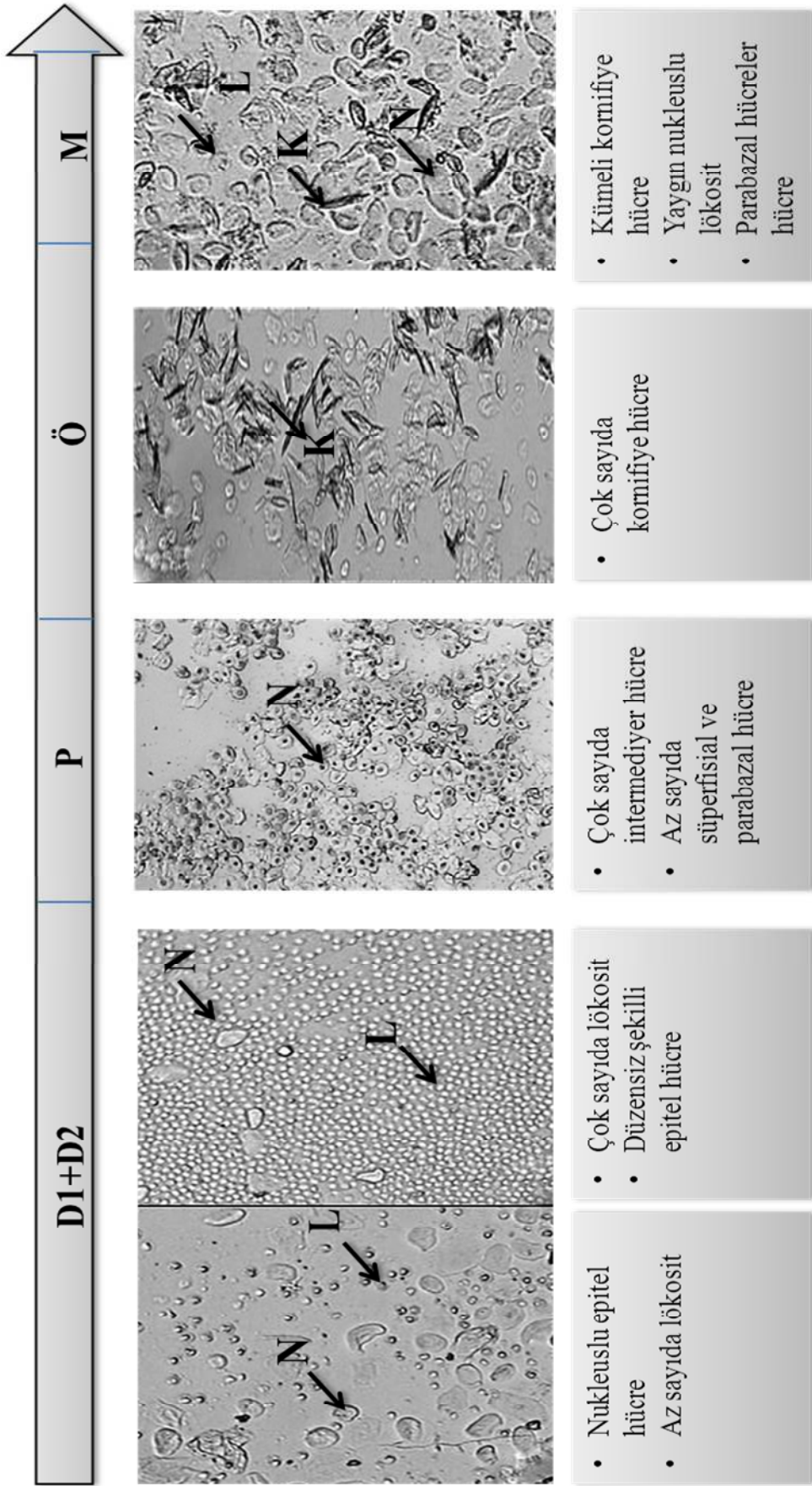
Şekil 3.1. Deneysel uygulama aşamaları.

3.5. Vajinal Simir Yöntemi

Sıçanlarda biyolojik ritmin döngüsel özelliğini gösteren ve östrus siklusu olarak tanımlanan dönemin kendi içindeki evreleri temel olarak foliküler evre, ovulasyon ve luteal evreden oluşur. Siklusun kontrolü hipotalamik-hipofizer-ovariyan hormonları tarafından sağlanmaktadır (24).

Çalışmamızda puberte ve östrus siklusu takibi için pratik ve güvenilir bir yöntem olan vajinal simir yöntemi kullanıldı. Deney sürecinde vajinal açıklık gözlenir gözlenmez hayvanlardan her gün sabah 08:30-09:30'da bir kez simir alındı ve östrus fazları takip edildi. Vajinal simir yöntemi şu şekilde gerçekleştirildi: İnce pastör pipetine alınan yaklaşık 100 µl SF ile vajina kanalında nazikçe yıkama yapıldı ve lam üzerine damlatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

Proöstrus fazına ait simir örneklerinde kümeler oluşturmuş nükleuslu epitel hücreleri bulunmaktadır. Proöstrus fazının ilerleyen döneminde ise kornifiye hücreler ve apikal yerleşimli nükleus içeren musinöz hücrelere rastlanmaktadır. Östrus fazında vajinal simir örneğinin % 90'ı nükleussuz kornifiye epitel hücrelerden oluşmaktadır. Metöstrusun başlamasıyla birlikte vajinal epitelin tüm tabakası döküldüğünden dolayı vajinal simirde kornifiye hücre miktarında artış gözlenir. Metöstrus fazının erken aşamasında yığınlar oluşturan kornifiye hücrelerin arasında nötrofillerin yer aldığı görülür. Fazın ilerleyen dönemlerinde ise, sıkıca kümelenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücrelerine rastlanırken, bu hücrelerin bir kısmında sitoplazmik vakuoller yer alır. Diöstrusta, vajinal epitelin dökülme işlemi sona ererken nükleuslu hücre miktarı artış gösterir ve simirde yoğun bir şekilde lökosit gözlenir. Diöstrus fazının erken aşamasında nötrofil sayısı daha çok artarken nükleuslu epitel hücreleri azalır. Fazın ilerleyen aşamalarında ise, vajina epiteli tabakasının incelmesi nedeniyle simirde az sayıda küçük boyutta nükleuslu epitel hücresiyle birlikte nötrofiller gözlenir. Östrus siklusu safhalarında görülen hücre tipleri Şekil 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Östrus fazlarına ait görüntüler ve karakteristik hücre tipleri (N= nukleuslu epitel, L= lökosit, K= kornifiye epitel)

3.6. Ovaryum Histolojisi

Tüm gruptaki sıçanların proöstrus fazında sağ ovaryumu alınarak yağ dokusundan arındırıldı ve % 10'luk formaldehitte fikse edildi. Örnekler parafin bloklara gömüldü. Her ovaryum dokusundan 6 µm kalınlığında her 10 kesitte bir 3 adet kesit alındı. Kesitler hematoksilin eozin (H&E) ile boyandı.

En büyük antral folikülün teka interna tabakasının kalınlığı mikroskopta ölçüldü. Farklı tip foliküllerin toplam sayısı ışık mikroskobu altında sayıldı. Kesitler Leica DFC280 ışık mikroskobu ile Leica Q Win ve Image Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) kullanılarak incelendi.

Foliküllerin sınıflandırılması aşağıdaki şekilde yapıldı:

Çevresi tek katlı yassı pregranüloza hücreleri ile sarılmış oositler (Şekil 4.6 B) primordiyal folikül, çevresi iki katlı kübik granüloza hücreleri ile sarılmış oositler primer folikül(Şekil 4.6 A) olarak sınıflandırıldı. Antral boşluk oluşmadan ve iki ya da çok katlı granüloza hücreleri ile sarılmış foliküller preantral folikül (Şekil 4.6 B), antral boşluğun belirginleştiği foliküller antral folikül (Şekil 4.6 A) olarak tanımlandı.

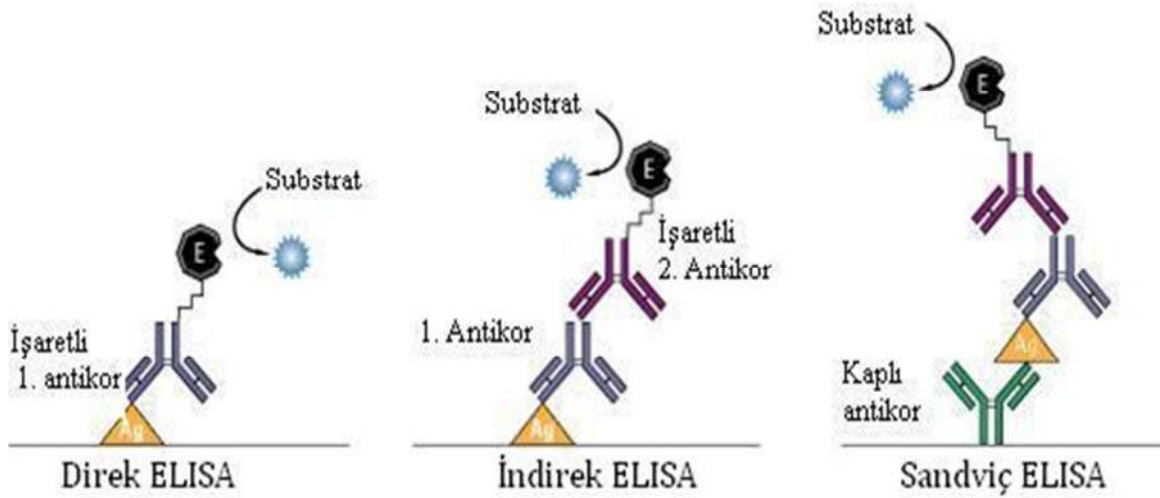
3.7. Enzyme Linked Immunsorbant Assay (ELISA) Yöntemi

Hormonlar da dahil olmak üzere herhangi bir proteinin ölçümünde enzime bağlı immünosorbent ölçümü (ELISA) kullanılır. Bu test, basit enzim analizlerinin duyarlılığıyla antikorların özgüllüğünü birleştirir (93). Bu tip ölçümlerde reaksiyon komponentlerinden biri solid faz yüzeyine bağlıdır. Bu katı faz mikro kuyucukların yüzeyidir. Tipik bir ELISA'da numune içindeki analitin katı fazdaki antijen veya antikora bağlanabilmesi için bir süre inkübe edilir. Bir sonraki basamak analitin enzim işaretli konjugat ile bağlanmasıdır. ELISA yöntemlerinin genel olarak iki türü vardır.

Yarışmalı: Sabit faza bağlanan antikor veya antijenin miktarı bu yöntemde standarttır. Örnek ve işaretli konjugat aynı anda ortama koyulur ve sabit faza bağlanabilmek için yarışır. Bu düzenekte, substrattan oluşan ürün miktarı, dolayısıyla elde edilen absorbans değeri ortamdaki serbest olarak bulunan analit ile ters orantılıdır.

Yarışmasız: Numune içindeki analit sabit faza bağlanması için bir süre inkübe edilir ve bağlanmayan maddeler yıkama işlemiyle ortamdaki uzaklaştırılır. Konjugat bir sonraki basamakta eklenir. Bu aşamada kullanılan konjugatlar genellikle antikordur ve analitin genellikle ikinci bir epitopuna özgüdürler. Bu türde elde edilen absorbans değeri ortamdaki analit ile doğru orantılıdır. Direkt ya da indirekt yöntemlerle uygulanabilir.

Şekil 3.3'te yarışmasız direkt, indirekt ve sandviç ELISA yöntemlerinin temel elemanlarını göstermektedir. Yöntemde 96 kuyucuklu plaktaki her kuyucuk ölçülecek analite özgül bir antikor/antijenle kaplıdır. Kuyucuklara örnek ya da standart konduktan sonra antikora özgül fakat antikorun farklı bir bölgesine bağlanan biyotinle işaretlenmiş ikinci bir antikor eklenir. Bu antikor sonraki adımda uygun substratla kolorimetrik olarak kolayca belirlenebilecek bir ürüne dönüştürülebilen bir enzimle eşleşir. Substrat renkli floresan ürünün oluşumunu katalizler (93).

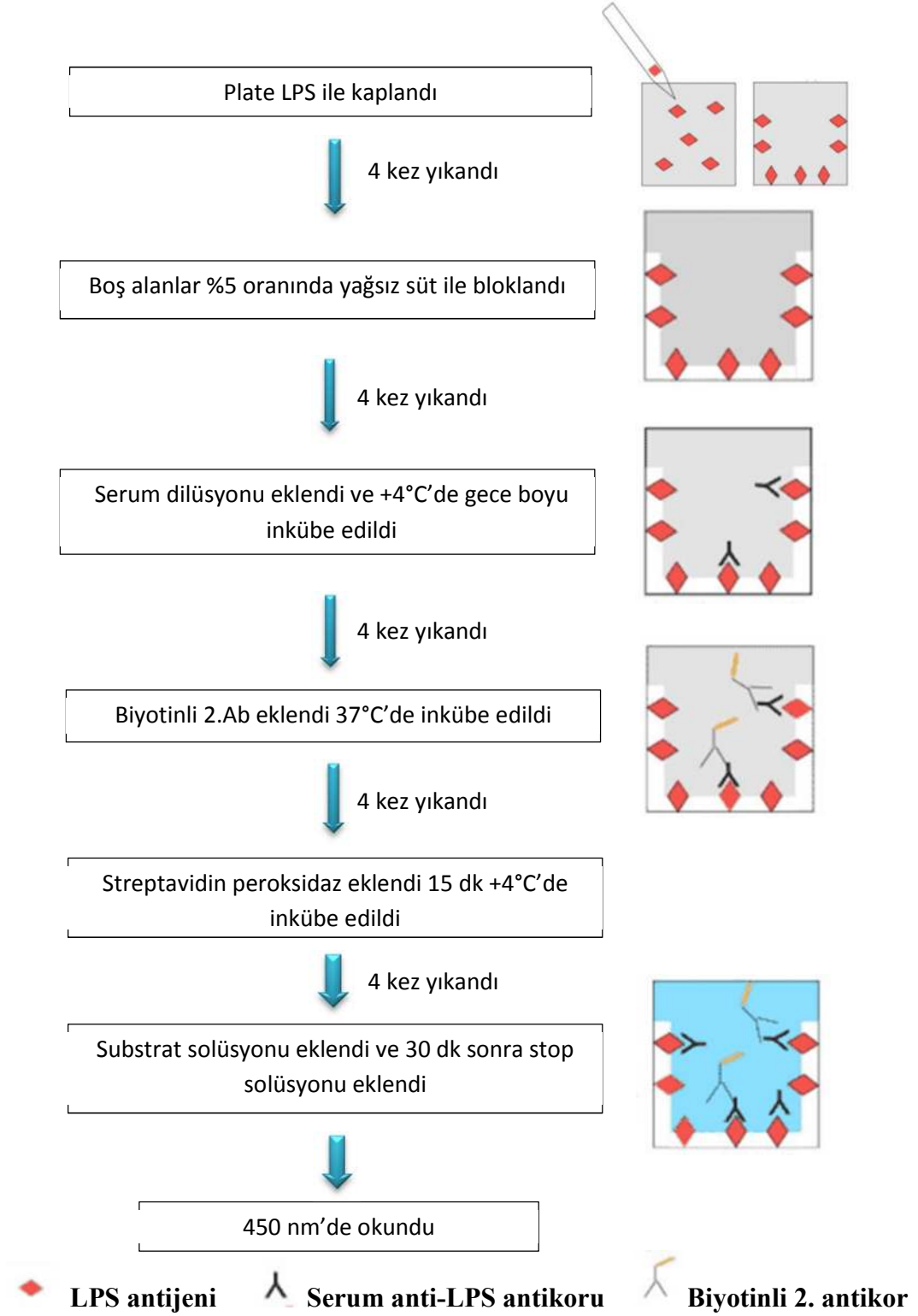


Şekil 3.3. ELISA yöntemleri (94).

3.8. Serum Anti-LPS Testi

Anti-LPS Testi Protokolü

- 1) LPS antijeni (*E. coli* O111:B4, Sigma L-2630), uygun konsantrasyonda kaplama solüsyonu içerisinde çözöldü ve 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pipetlenerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminin ardından plate 4 kez yıkanarak ters çevrildi ve sıvı kısmı dökmek için kağıt havluya 4-5 kez vuruldu.
- 2) Platenin boş alanlarını kaplamak üzere fosfat buffer solüsyonu içerisinde %5'lik yağsız süt solüsyonundan 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pipetlenerek inkübasyona bırakıldı.
- 3) İnkübasyon sonunda plate aynı şekilde 4 kez yıkandı ve kurutuldu.
- 4) Tüm serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- 5) Kuyucuklara seyreltilmiş serum örneklerinden 50 µl eklendi ve gece boyunca +4°C'de inkübe edildi.
- 6) Plate 4 kez yıkandı.
- 7) Biotinli 2. antikor 100 µl/kuyucuk olacak şekilde pipetlendi ve inkübasyona bırakıldı.
- 8) Plate 4 kez yıkandı.
- 9) Streptavidin-Peroksidaz Conjugate 100 µl/kuyucuk eklendi, +4°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 10) Plate 4 kez yıkandı.
- 11) Substrat solüsyonu 150 µl/kuyucuk eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 12) İnkübasyon sonunda mavi renk oluştu. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyon eklendi ve renk maviden sarıya dönüştü.
- 13) 450 nm dalga boyunda mikropate okuyucu (Biotek Synergy HT) ile absorbanslar okundu. Elde edilen optik dansiteler değerlendirildi.



Şekil 3.4. Anti-LPS testi protokolü.

3.9. Serum IL-1 β Düzeylerinin Saptanması

Serum IL-1 β ölçümü için rat IL-1 β ELISA kiti (eBioscience) kullanıldı. Testte kullanılan solüsyonlar kısaca aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Assay buffer: 95 ml deiyonize suya Assay buffer konsantre solüsyondan 5 ml eklenerek hazırlandı.

Yıkama solüsyonu: 950 ml deiyonize suya konsantre solüsyondan 50 ml eklenerek hazırlandı.

Biotin-Conjugate: 30 dakika içerisinde kullanılmak üzere 5.94 ml assay buffer içerisine 60 μ l biotin conjugate eklenerek hazırlandı.

Streptavidin-HRP: 30 dakika içerisinde kullanılmak üzere 11.94 ml assay buffer içerisine 60 μ l streptavidin-HRP eklenerek hazırlandı.

Standart dilüsyonlarının hazırlanması (1-7): Standart kuyucuklarının her birine 100 μ l sample dilüent eklendi. İlk kuyucukta konsantrasyon 2000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı ve bu tüpten 100 μ l diğer tüplere sırasıyla aktarıldı. IL-1 β yoğunluğu, birinci standarttan yedinci standarta kadar aşağıdaki şekilde sırasıyla 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 31 pg/ml oldu.

Test protokolü Tablo 3.2’de belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.2. Serum IL-1 β ölçüm protokolü.

	BLANK	STANDART	SERUM
Sample dilüent	100 μ l	---	50 μ l
Std/ Numune	---	100 μ l	50 μ l
Biotin-Conjugate	50 μ l	50 μ l	50 μ l
2 saat oda ısısında inkübasyon			
Yıkama x 3			
Streptavidin-HRP	100 μ l	100 μ l	100 μ l
1 saat oda ısısında inkübasyon			
Yıkama x 3			
Substrat	100 μ l	100 μ l	100 μ l
10 dakika oda ısısında inkübasyon			
Stop solüsyonu	100 μ l	100 μ l	100 μ l
450 nm okuma			

Blank, standart ve numunelerin absorbans değerleri mikropate okuyucu spektrofotometrede (Biotek Synergy HP) okunarak standart grafiği hazırlandı ve numunelerin absorbansları bu standart grafiğiyle karşılaştırılarak konsantrasyonları hesaplandı.

3.10. Serum TNF- α Düzeylerinin Saptanması

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

Serum örnekleri: Serumlar 1:2 oranında inkübasyon solüsyonu ile seyreltilerek kullanıldı.

Yıkama solüsyonu: Deiyonize su ile 25 kat sulandırılarak hazırlandı.

Streptavidin-HRP: Streptavidin-HRP dilüent solüsyonu ile 100 kat sulandırılarak hazırlandı ve 15 dakika içerisinde kullanıldı.

Standart dilüsyonlarının hazırlanması (1-7): 2-7. standart tüpün her birine 300 μ l standart solüsyonu eklendi. Birinci standart tüpüne 375 μ l standart dilüent

solüsyonu üzerine stok standart solüsyonundan (2000 pg/ml) 225 µl eklendi ve bu tüpten diğer standart tüplerine sırasıyla 300 µl aktarıldı. TNF- α yoğunluğu, birinci standarttan yedinci standarta kadar sırasıyla 750, 375, 187.5, 93.8, 46.9, 23.4, 11.7 pg/ml oldu. Hazırlanan standartlar 60 dakika içerisinde kullanıldı.

Test protokolü aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.3. Serum TNF- α ölçüm protokolü.

	BLANK	STANDART	SERUM
Standart dilüent solüsyonu	100 µl	---	---
Std/Numune	---	100 µl	100 µl
2 saat oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon			
Yıkama x 4			
Biyotin-Conjugate	---	100 µl	100 µl
1 saat oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon			
Yıkama x 4			
Streptavidin-HRP	---	100 µl	100 µl
30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon			
Yıkama x 4			
Stabilize Kromojen	100 µl	100 µl	100 µl
30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon			
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
450 nm okuma			

3.11. Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin Saptanması

NO, biyolojik sistemlerde üretildikten sonra birkaç saniye gibi çok kısa sürede nitrit (NO₂) ve ardından nitrat (NO₃)'a oksitlenir. Nitrat formu, NO türevlerinin en kararlı yapısıdır (95, 96). Bu nedenle çalışmada, numunede bulunan nitratı nitrit formuna redükleyen nitrat redüktaz ile nitrit ölçümü yapıldı. Sonuçta ortamda bulunan toplam nitrit ve nitrat formu ölçülmüş oldu.

Kullanılan Reaktifler

1. **Sodyum hidroksit çözeltisi:** Sodyum hidroksit granülleri distile su ile çözülerek 82 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.
2. **Çinko sülfat çözeltisi:** Çinko sülfat, distile su içerisinde çözülerek 55 mmol/L'lik konsantrasyona getirildi.
3. **Aspergillus Nitrat redüktaz çözeltisi (Enzim):** 10 U/ml olacak şekilde distile su ile seyreltildi.
4. **NADPH (Koenzim):** 50 μ mol/L olacak şekilde distile suda çözüldü.
5. **FAD (Enzim):** 5 μ mol/L olacak şekilde distile suda çözüldü.
6. **α -Naphthylamine çözeltisi:** %0,1 α -naphtylamine olacak şekilde suda çözüldü.
7. **p-Aminobenzene sulfanilamide:** % 1 sülfanilamid olacak şekilde, %5 fosforik asit içerisinde çözüldü.
8. **Griess reaktifi:** Bir birim sülfanilamid çözeltisi ile bir birim α -naphtylamine çözeltisi karıştırıldı.
9. **Standart çözeltiler:** Stok sodyum nitrit ve sodyum nitrat çözeltileri kullanılarak 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 μ mol/L konsantrasyonlarda standartları hazırlandı.
10. **LDH:** 5 U/ml olacak şekilde distile su ile seyreltildi.

Deney Protokolü

1. Deproteinizasyon

Tablo 3.4. Serum numunelerinin deproteinizasyon protokolü.

100 µl numune alındı
Üzerine 200 µl çinko sülfat eklendi
1 dakika vorteksle ve en az 5 dakika oda ısında bekletildi
Üzerine 300 µl sodyum hidroksit eklendi
5 dakika vortekslendi
4000 rpm’de 25 dk. santrifüj edildi
Süpernatant temiz bir tüpe alındı
Süpernatant NO ₂ analizinde kullanıldı

2. Nitrat redüksiyonu

Numunelerde bulunan nitrat moleküllerinin nitrit haline redüksiyonunu gerçekleştirmek için 96 kuyucuklu mikropate tüplerine Tablo 3.5’te belirtildiği gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 3.5. Nitrik oksit ELISA protokolü.

	Standart tüpü	Numune tüpü
Distile su (µl)	125	---
Standart (µl)	25	---
Numune (µl)	---	25
NO reaktifi (µl)	---	100
2 saat 37 °C' inkübasyon		
LDH (µl)	---	25
30 dakika 37 °C' inkübasyon		
Griess reaktifi (µl)	100	100
30 dakika oda ısısında hafif devir karıştırma ile inkübasyon		
550 nm' de okuma		

Numune ve standart absorbans değerleri mikropate okuyucu spektrofotometrede (Biotek Synergy HP) okunduktan sonra kaydedildi. Standart grafiği hazırlandı ve numunelerin absorbansları bu standart grafiğiyle karşılaştırılarak konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçta numunede bulunan Nitrat+Nitrit konsantrasyonları bulunmuş oldu.

3.12. İstatistiksel Analiz

Tüm grupların parametrelerine ait verilerin istatistiksel analizlerinde Windows for SPSS 15.0 yazılım programı kullanıldı. Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında One-Way ANOVA testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart hata olarak sunuldu. Parametreler arasındaki ilişkileri belirlemede Pearson Correlation testi kullanıldı. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Vücut Ağırlığı Değişimi

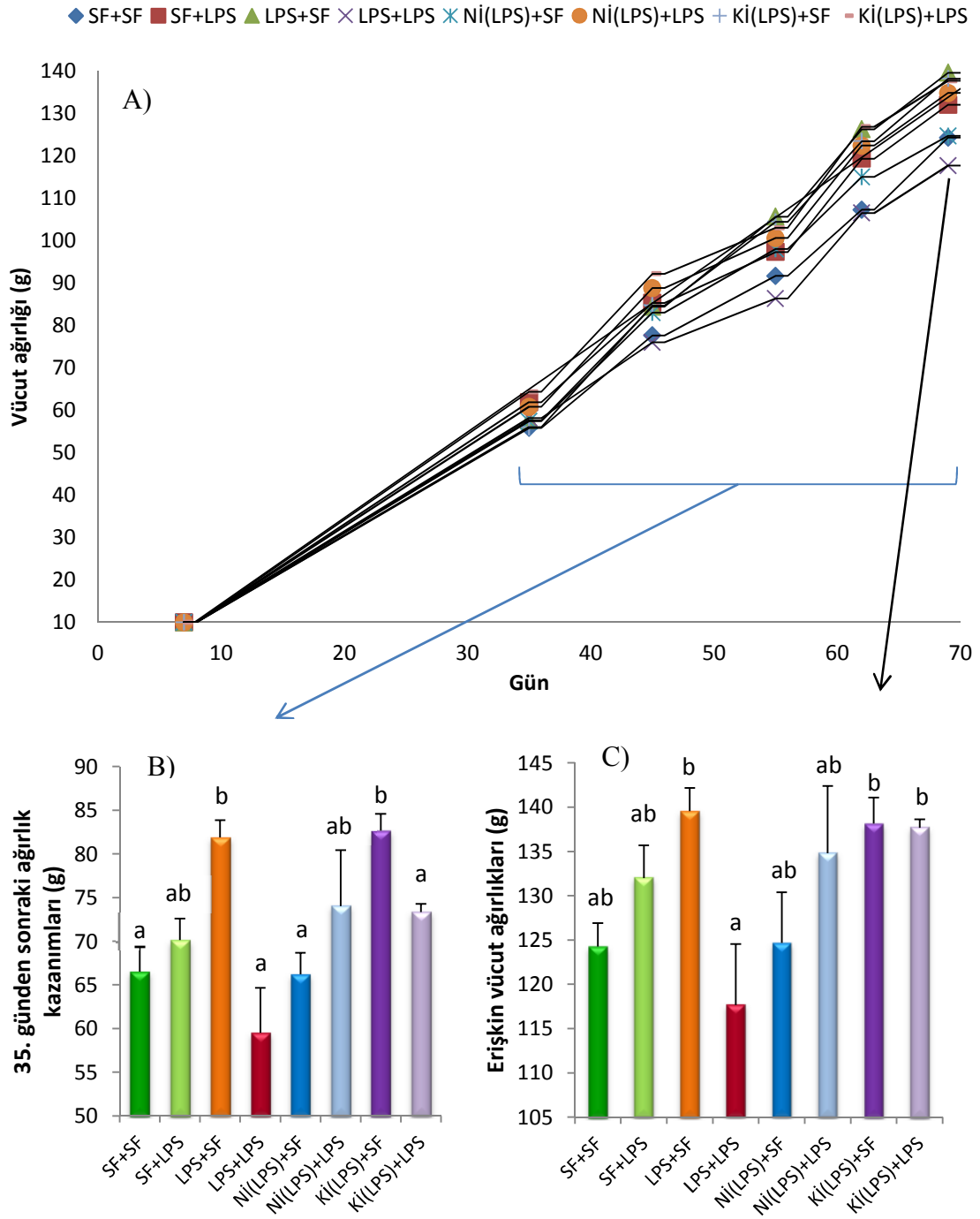
Tablo 4.1. Tüm grupların vücut ağırlığı değişimi (g). Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır.

SF+SF= Salin+Salin, SF+LPS= Salin+LPS, LPS+SF= LPS+Salin,

Nİ(LPS)+SF= L-NAME(LPS)+Salin, Nİ(LPS)+LPS= L-NAME(LPS)+LPS,

Kİ(LPS)+SF= Q-Vd-OPH(LPS)+Salin, Kİ(LPS)+LPS= Q-Vd-OPH(LPS)+LPS.

Gruplar	7. gün	35. gün	45. gün	55. gün	62. gün	69. gün
SF+SF	10	56±2,2	78±2,6	92±4,3	107±3,9	124±2,6 ^{ab}
SF+LPS	10	62±2,3	85±3,9	97±3,9	119±3,9	132±3,6 ^{ab}
LPS+SF	10	58±1,9	84±4,1	106±2,3	126±3,1	140±2,6 ^b
LPS+LPS	10	58±2,1	76±6,1	86±7,2	107±7,1	118±6,8 ^a
Nİ(LPS)+SF	10	57±4,8	83±6,0	98±5,8	115±5,7	125±5,7 ^{ab}
Nİ(LPS)+LPS	10	61±2,9	89±3,6	101±3,4	122±5,5	135±7,5 ^{ab}
Kİ(LPS)+SF	10	56±2,3	84±2,3	104±2,7	123±3,5	138±2,9 ^b
Kİ(LPS)+LPS	10	64±1,8	92±2,3	103±1,7	127±1,9	138±0,9 ^b



Şekil 4.1. Tüm grupların vücut ağırlık grafikleri.

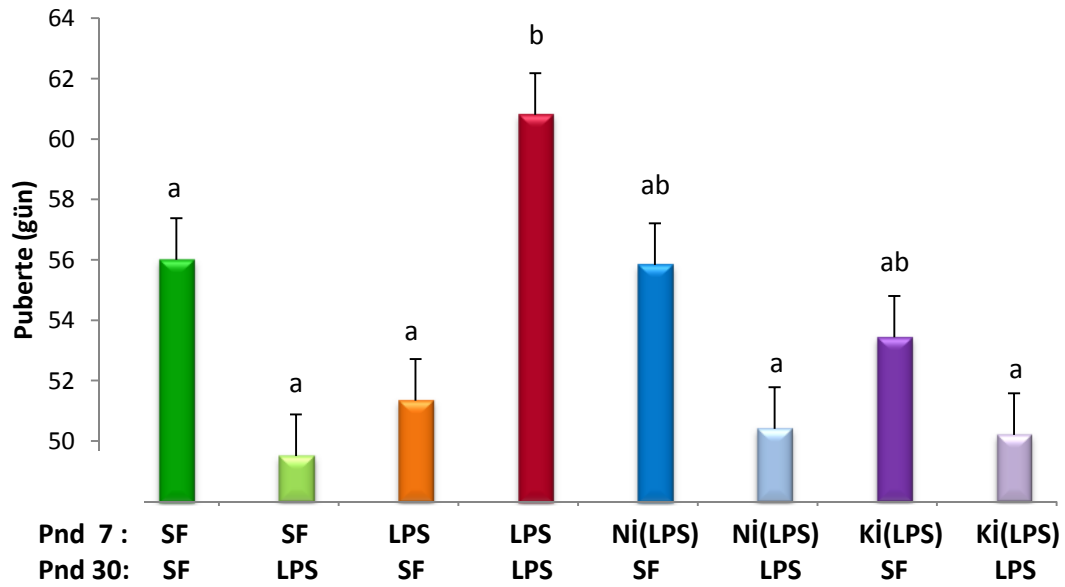
A) Grupların deney süresince ağırlık değişimleri, B) Grupların 35. günden 69. güne kadar ağırlık kazanımları, C) Grupların erişkin (69. gün) vücut ağırlıkları.

Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.05$. (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

4.2. Puberte ve Östrus Döngüsü Bulguları

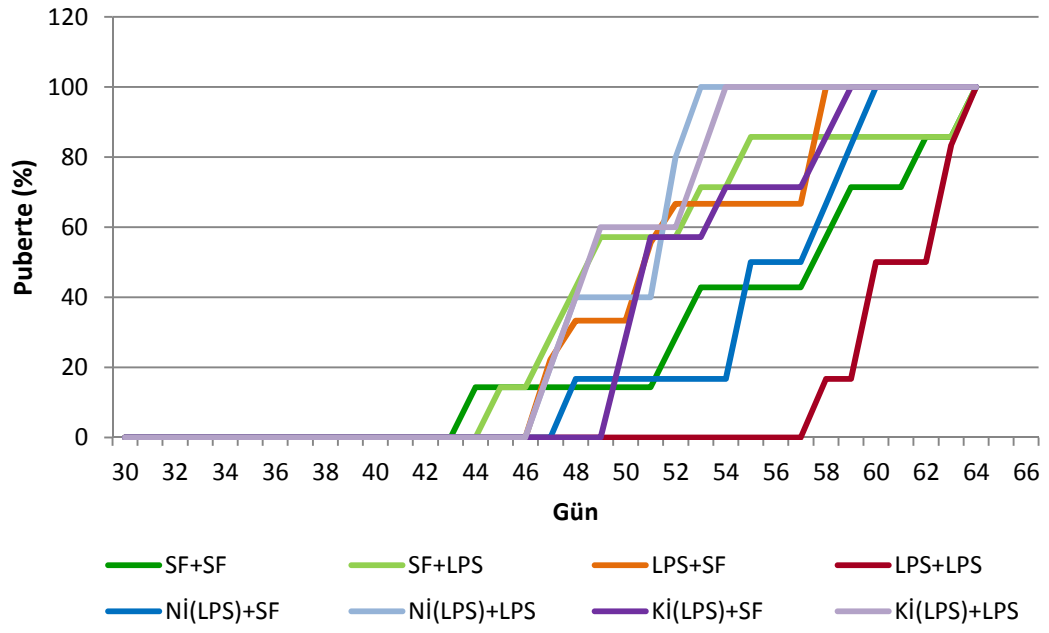
Tablo 4.2. Tüm grupların puberteye ulaşma zamanları (gün) ve puberteye ulaştıkları vücut ağırlıkları (g).

Gruplar	Puberte	Puberte vücut ağırlığı
SF+SF	56±2,59 ^a	99,1±5,9
SF+LPS	49,5±1,5 ^a	96,2±2,1
LPS+SF	51,3±1,2 ^a	101,5±3,9
LPS+LPS	60,8±0,9 ^b	107,4±6,5
Nİ(LPS)+SF	55,8±1,7 ^{ab}	104,8±1,6
Nİ(LPS)+LPS	50,4±1,2 ^a	99,8±5,4
Kİ(LPS)+SF	53,4±1,5 ^{ab}	105,4±4,7
Kİ(LPS)+LPS	50,2±1,3 ^a	101±5,4

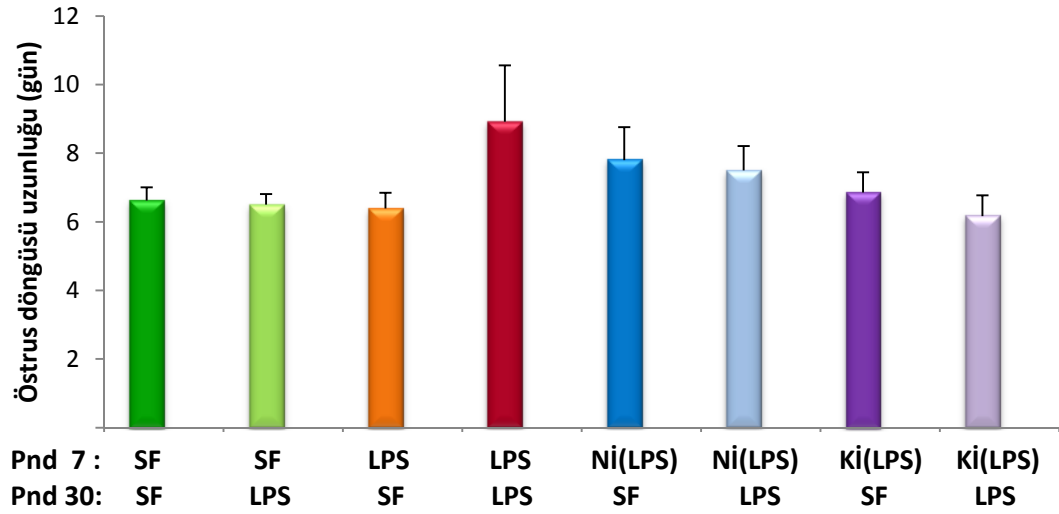


Şekil 4.2. Grupların puberteye ulaşma günleri

Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. P_a ve $b < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s. 42).



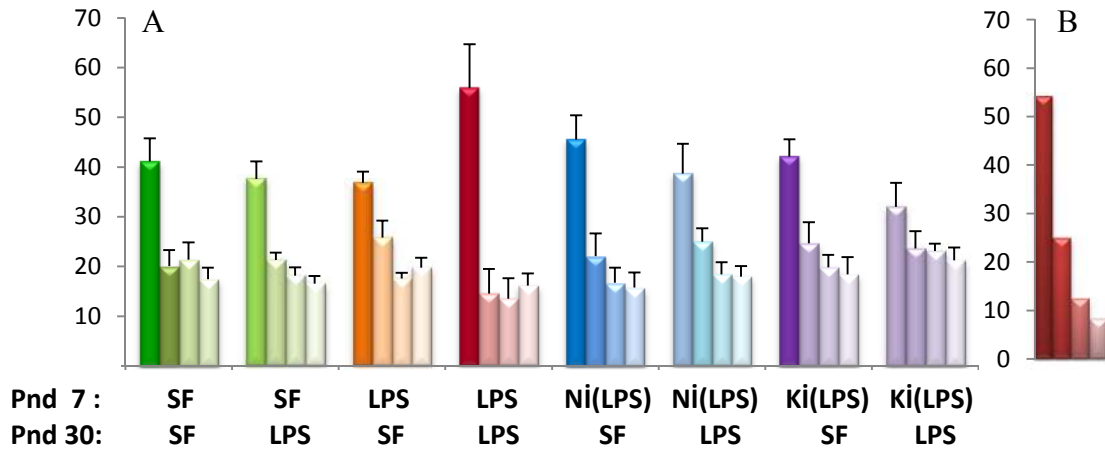
Şekil 4.3. Tüm grupların günlere göre pubeteye ulaşma yüzdeleri (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).



Şekil 4.4. Grupların ortalama östrus döngüsü uzunluğu. Gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

Tablo 4.3. Tüm grupların takip edilen östrus siklusu fazlarına ait yüzde değerleri (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

Gruplar	% Proöstrus	% Östrus	% Metöstrus	% Diöstrus
SF+SF	21,4±3,4	20,0±3,2	17,4±2,3	41,1±4,6 ^{ab}
SF+LPS	18,1±1,6	21,3±1,4	16,5±1,5	37,5±3,5 ^{ab}
LPS+SF	17,5±1,2	25,8±3,4	19,7±1,9	36,8±2,2 ^{ab}
LPS+LPS	13,5±4,1	14,5±5,0	16,1±2,4	55,8±8,8 ^a
Nİ(LPS)+SF	16,7±3,0	22,0±4,6	15,7±3,0	45,5±4,9 ^{ab}
Nİ(LPS)+LPS	18,4±2,4	24,9±2,7	17,9±2,1	38,6±6,0 ^{ab}
Kİ(LPS)+SF	19,8±2,5	24,6±4,2	18,4±3,4	42,1±3,4 ^{ab}
Kİ(LPS)+LPS	23,1±1,4	23,6±3,4	21,2±2,6	32,0±4,8 ^b



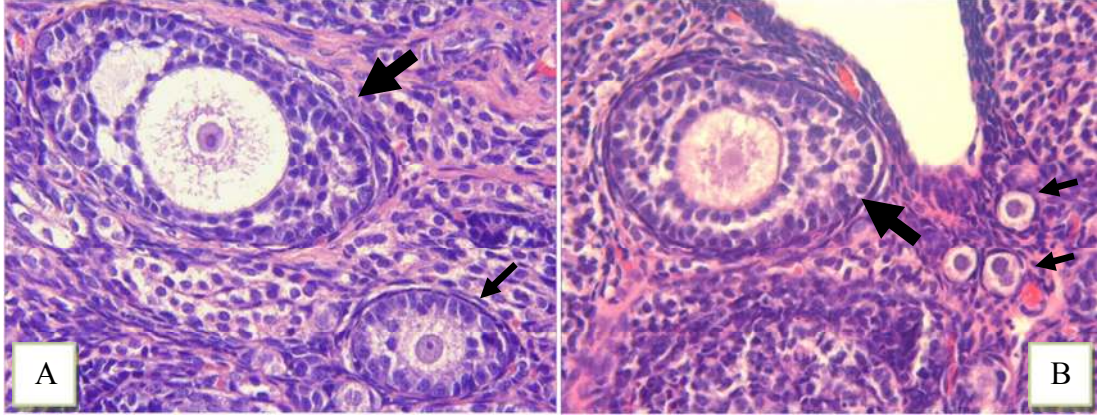
Şekil 4.5. Grupların östrus siklusu fazlarının yüzde değerleri. Grafiklerin sıralaması % diöstrus, % östrus, % proöstrus, % metöstrus olarak sunulmuştur (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

A) Tüm gruptaki hayvanların östrus siklusu fazlarının yüzde değerleri

B) Düzenli östrus siklusu fazlarının yüzde değerleri

Tüm sıçanların östrus siklusları Ek.1’de sunulmuştur.

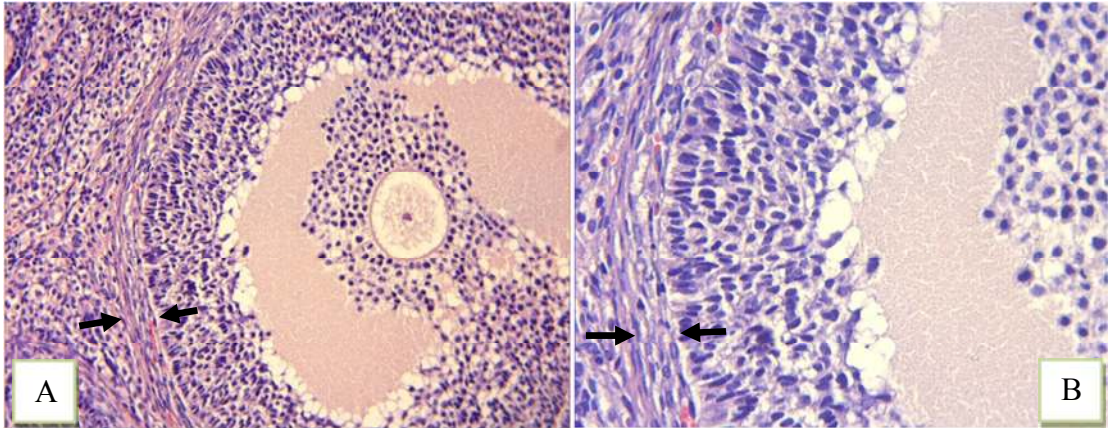
4.3. Ovaryum Histolojisi



Şekil 4.6. Ovaryumda bulunan farklı folikül tipleri

A. Antral folikül (kalın ok), primer folikül (ince ok). H&E X 40.

B. Preantral folikül (kalın ok), primordiyal foliküller (ince ok). H&E X 40.



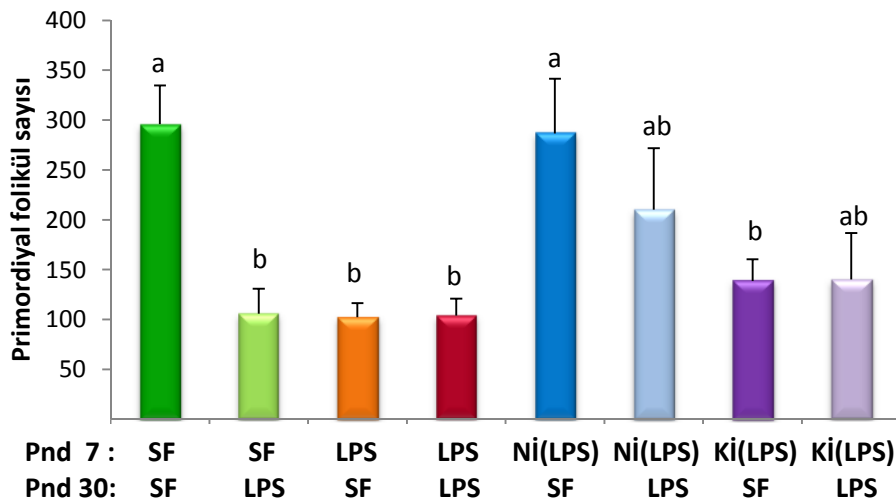
Şekil 4.7. Ovaryumda bulunan en büyük antral folikülün teka interna tabakası

A. Ovaryumda bulunan en büyük antral folikülün teka interna kalınlığı (oklar arasındaki kısım). H&E X 20.

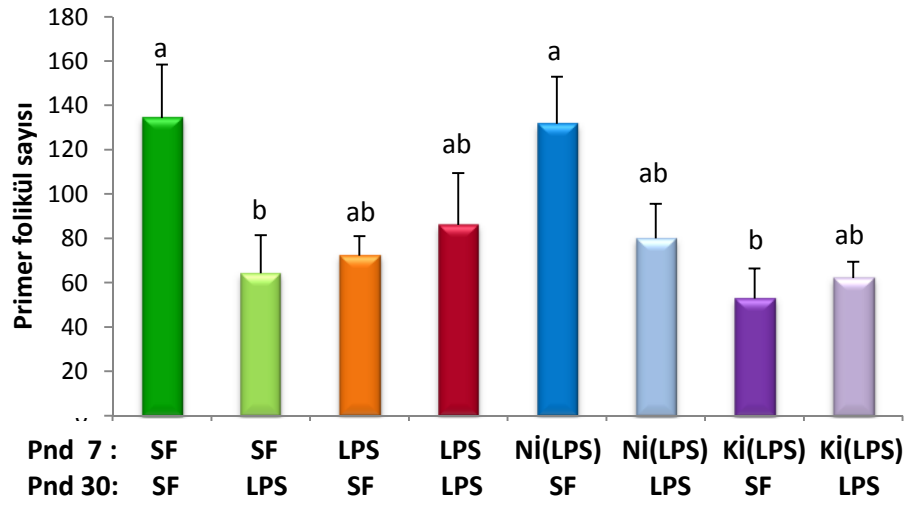
B. Teka interna tabakası (oklar arasındaki kısım). H&E X 40.

Tablo 4.4. Tüm grupların sağ ovaryumunda bulunan primordiyal, primer, preantral, antral folikül sayıları ve teka interna tabakası kalınlığı (μm) (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

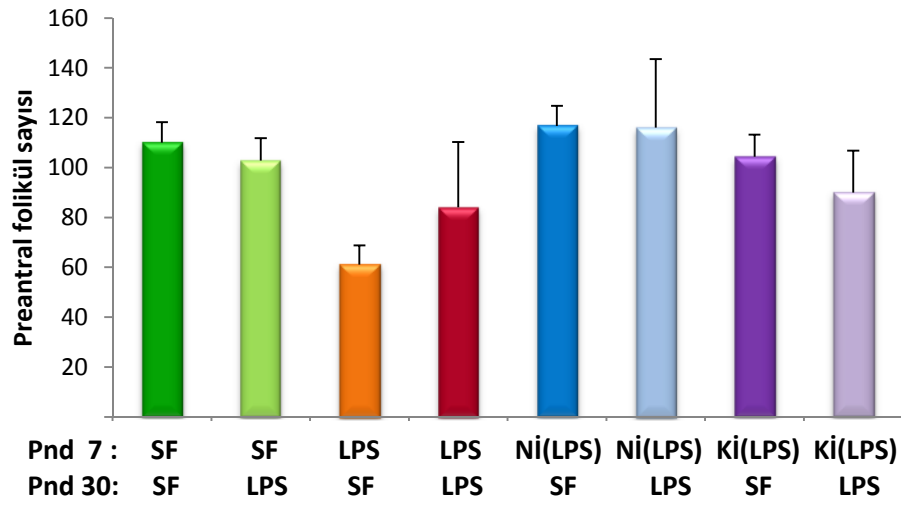
Gruplar	Primordiyal	Primer	Preantral	Antral	Teka interna
SF+SF	295,7 $\pm$ 38,9 ^a	134,2 $\pm$ 24,1 ^a	110,0 $\pm$ 8,1	74,2 $\pm$ 15,5 ^{ab}	18,9 $\pm$ 0,5
SF+LPS	105,7 $\pm$ 24,9 ^b	64,2 $\pm$ 17,1 ^b	102,8 $\pm$ 8,9	60,0 $\pm$ 8,4 ^{ac}	19,6 $\pm$ 0,4
LPS+SF	102,2 $\pm$ 14,2 ^b	72,2 $\pm$ 8,7 ^{ab}	61,1 $\pm$ 7,7	52,2 $\pm$ 13,6 ^a	21,2 $\pm$ 0,6
LPS+LPS	104,0 $\pm$ 16,9 ^b	86,0 $\pm$ 23,3 ^{ab}	84,0 $\pm$ 26,1	56,0 $\pm$ 22,9 ^{ac}	21,0 $\pm$ 0,6
Nİ(LPS)+SF	286,6 $\pm$ 54,8 ^a	131,6 $\pm$ 21,2 ^a	116,6 $\pm$ 8,0	136,6 $\pm$ 20,7 ^b	19,2 $\pm$ 1,0
Nİ(LPS)+LPS	210,0 $\pm$ 61,8 ^{ab}	80,0 $\pm$ 15,4 ^{ab}	116,0 $\pm$ 27,4	74,0 $\pm$ 5,0 ^{ab}	18,0 $\pm$ 1,2
Kİ(LPS)+SF	138,5 $\pm$ 21,6 ^b	52,8 $\pm$ 13,5 ^b	104,2 $\pm$ 8,9	112,8 $\pm$ 17,4 ^{ab}	19,0 $\pm$ 0,5
Kİ(LPS)+LPS	140,0 $\pm$ 46,8 ^{ab}	62,0 $\pm$ 7,3 ^{ab}	90,0 $\pm$ 16,7	126,0 $\pm$ 21,6 ^{bc}	18,0 $\pm$ 1,0



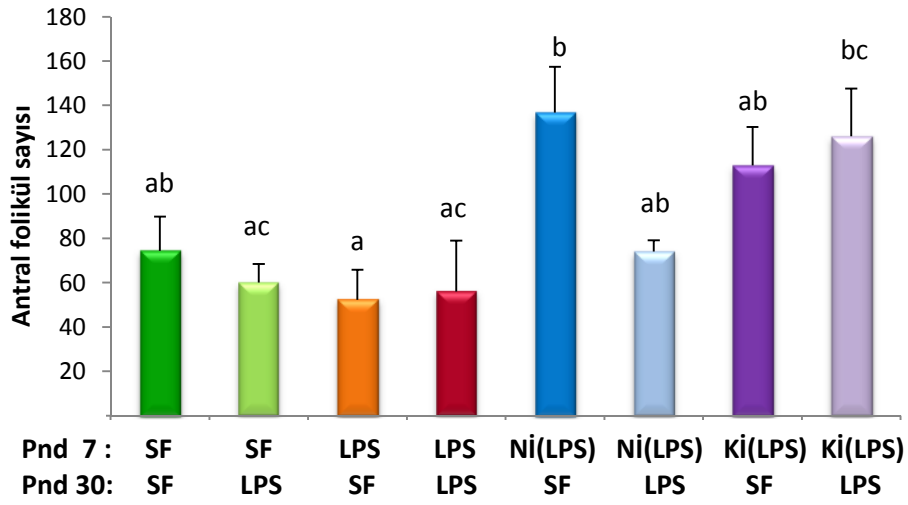
Şekil 4.8. Tüm grupların primordiyal folikül sayıları. Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).



Şekil 4.9. Tüm grupların primer folikül sayıları. Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

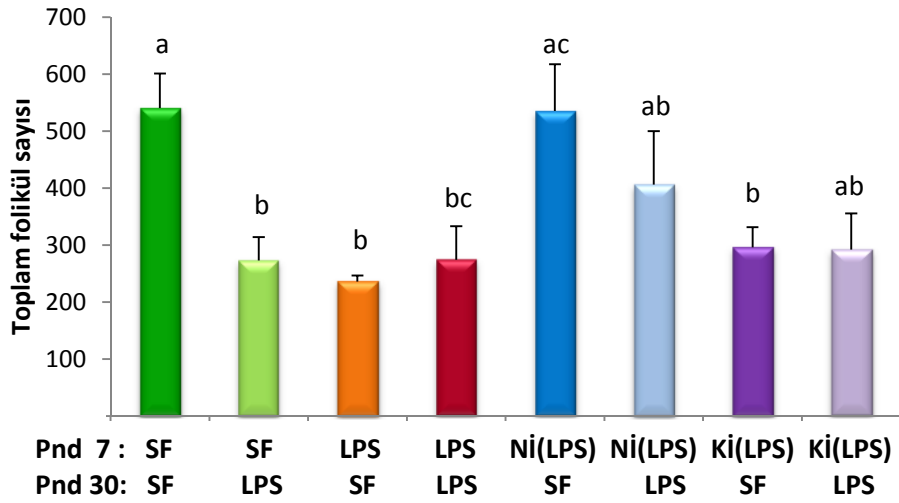


Şekil 4.10. Tüm grupların preantral folikül sayıları. Gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).



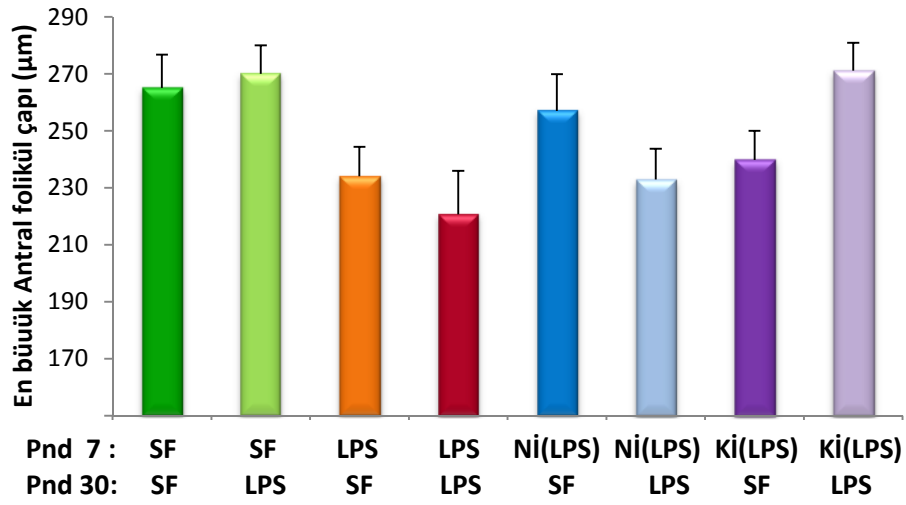
Şekil 4.11. Tüm grupların antral folikül sayıları.

Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.05$; $P_{a \text{ ve } c} < 0.05$; $P_{b \text{ ve } c} < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

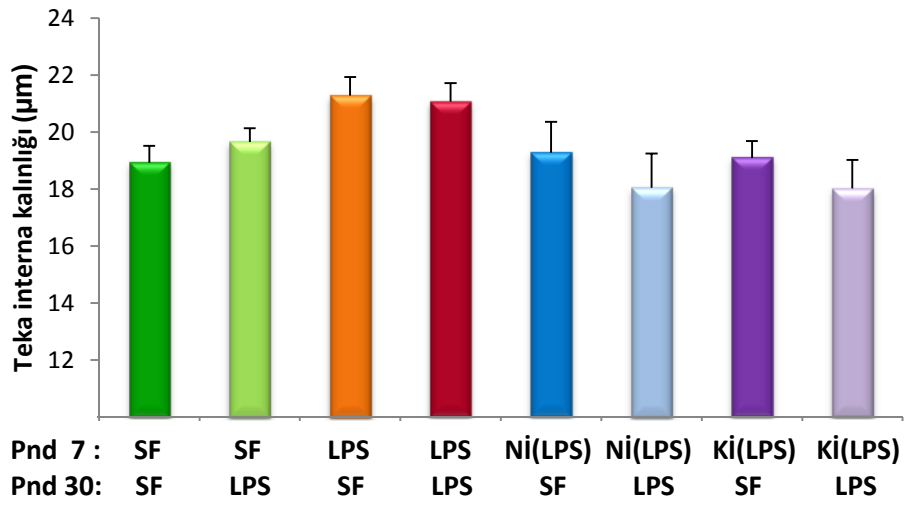


Şekil 4.12. Tüm grupların toplam folikül sayıları.

Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.05$; $P_{a \text{ ve } c} < 0.05$; $P_{b \text{ ve } c} < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

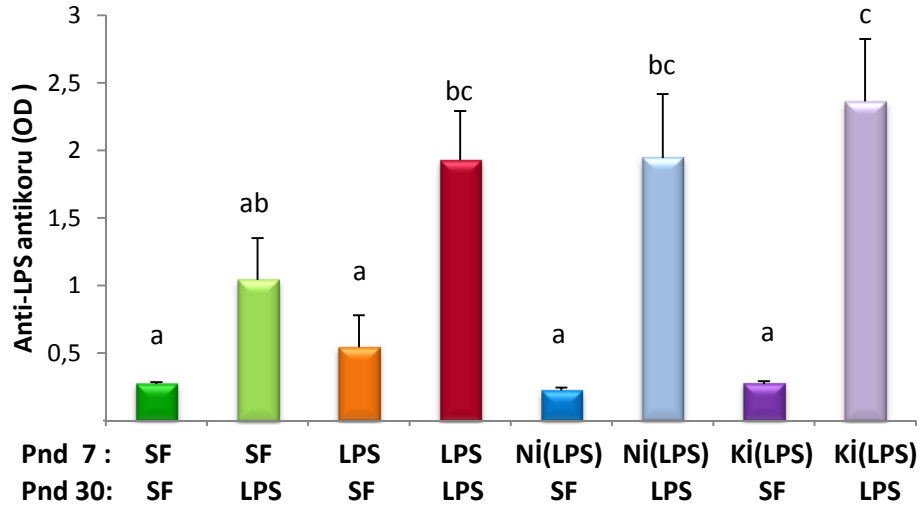


Şekil 4.13. Tüm grupların en büyük antral folikül çapı. Gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).



Şekil 4.14. Tüm grupların teka interna kalınlığı. Gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

4.4. Serum Anti-LPS testi sonuçları



Şekil 4.15. Grupların serum anti-LPS antikor ELISA testinin 450 nm’de optik dansite değerleri.

Farklı harf bulunan gruplar birbirinden farklıdır. $P_{a \text{ ve } b} < 0.01$; $P_{a \text{ ve } c} < 0.01$; $P_{b \text{ ve } c} < 0.05$ (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

Testte indirek ELISA yöntemi kullanılarak her numune iki defa çalışıldı.

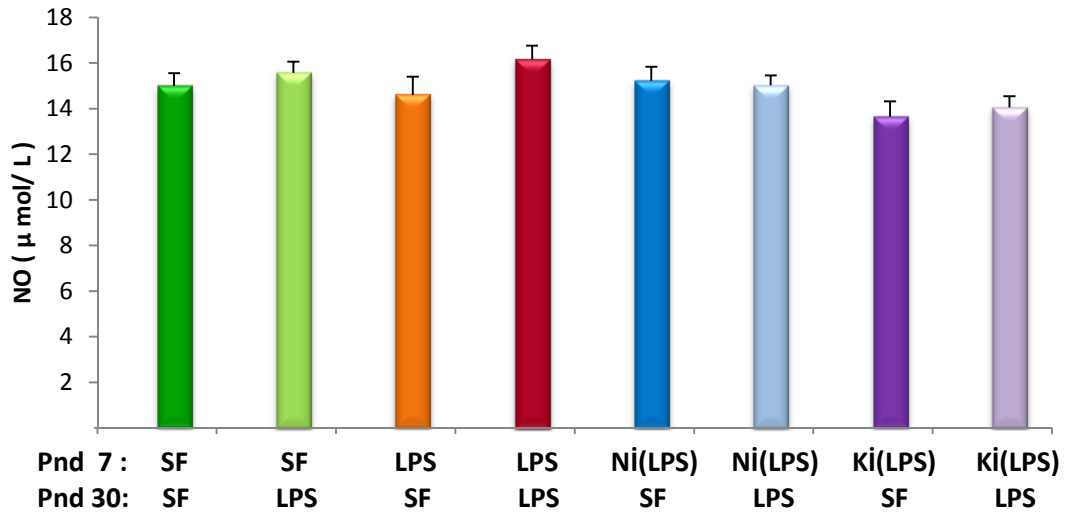
4.5. Serum IL-1 β , TNF- α Sonuçları

Satın alınan test kitleri ile yapılan analizler sonucunda Serum IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin tespit edilebilir aralıkta olmaması nedeniyle kullanılabilir sonuçlar elde edilememiştir.

4.6. Serum Nitrik Oksit Sonuçları

Tablo 4.5. Tüm grupların serum nitrik oksit konsantrasyonları ($\mu\text{mol/L}$).

Gruplar	NO ($\mu\text{mol/L}$)
SF+SF	14,9 $\pm$ 0,5
SF+LPS	15,5 $\pm$ 0,4
LPS+SF	14,6 $\pm$ 0,8
LPS+LPS	16,1 $\pm$ 0,6
Nİ(LPS)+SF	15,2 $\pm$ 0,6
Nİ(LPS)+LPS	15,0 $\pm$ 0,4
Kİ(LPS)+SF	13,6 $\pm$ 0,6
Kİ(LPS)+LPS	14,0 $\pm$ 0,5

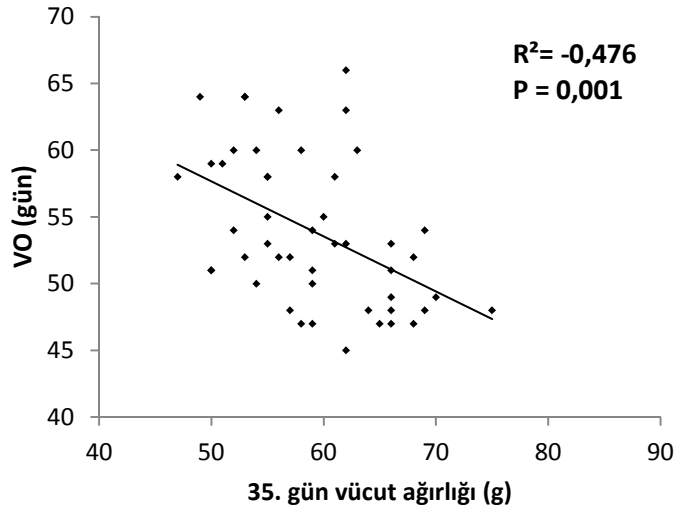


Şekil 4.16. Grupların serum nitrik oksit konsantrasyonları. Gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Grup kısaltmaları için bkz. s.42).

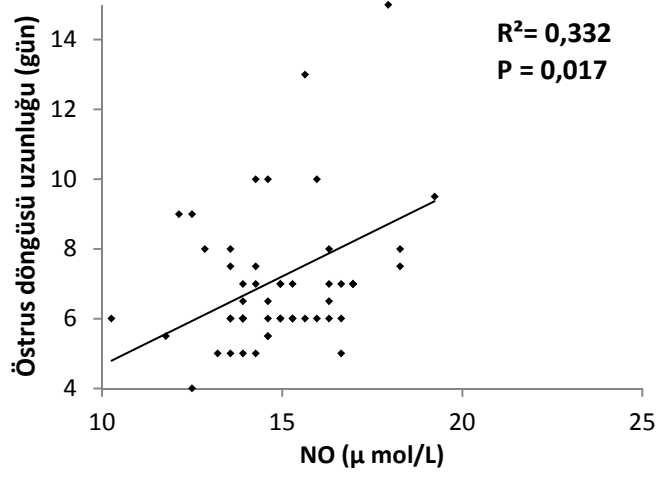
4.6. Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

Tablo 4.6. Parametrelerin birbirleri ile ilişkisi (* <0,05, ** < 0,005). (VO= Vajinal açıklık).

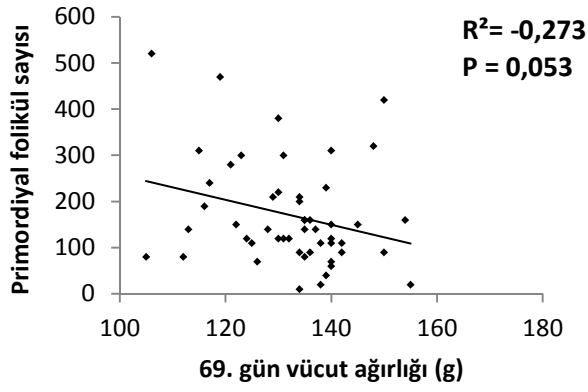
	Östrus döngüsü uzunluğu	Vücut ağırlığı (69.gün)	Vücut ağırlığı (35.gün)	VO	VO vücut ağırlığı	Anti-LPS antikoru	Östrus %	NO	Primordiyal folikül sayısı	Primer folikül sayısı	Preantral folikül sayısı
Vücut ağırlığı (69.gün)	-0,277(*) 0,049										
Vücut ağırlığı (35.gün)	-0,257 0,085	0,566(**) 0,000									
VO	0,220 0,125	-0,502(**) 0,000	-0,476(**) 0,001								
VO vücut ağırlığı	-0,106 0,458	0,406(**) 0,003	0,309(*) 0,037	0,436(**) 0,002							
NO	0,332(*) 0,017	-0,368(**) 0,008	-0,021 0,892	-0,058 0,691	-0,289(*) 0,039	0,146 0,307	0,070 0,625				
Primordiyal folikül sayısı	0,245 0,083	-0,273(*) 0,053	-0,084 0,579	0,056 0,698	-0,208 0,142	-0,247 0,081	-0,184 0,196	0,054 0,708			
Primer folikül sayısı	0,061 0,670	-0,326(*) 0,020	-0,089 0,555	0,169 0,242	-0,167 0,240	-0,087 0,546	-0,085 0,552	0,154 0,279	0,632(**) 0,000		
Preantral folikül sayısı	-0,079 0,583	-0,109 0,447	0,080 0,597	0,013 0,926	-0,051 0,723	0,049 0,734	-0,013 0,929	0,002 0,989	0,565(**) 0,000	0,422(*) 0,01	
Antral folikül sayısı	0,162 0,255	0,154 0,280	0,242 0,105	-0,158 0,273	0,071 0,623	0,090 0,530	0,139 0,331	0,025 0,863	0,320(*) 0,022	0,141 0,322	0,406(**) 0,003
Teka interna kalınlığı	-0,041 0,777	0,039 0,787	-0,049 0,747	0,145 0,314	0,121 0,397	-0,143 0,317	-0,283(*) 0,044	0,109 0,447	-0,167 0,242	0,054 0,708	-0,213 0,133
En büyük Antral folikülün çapı	-0,103 0,471	0,073 0,611	0,023 0,878	-0,113 0,437	-0,181 0,204	-0,128 0,372	0,009 0,952	-0,022 0,876	0,285(*) 0,043	0,152 0,289	0,353(*) 0,011



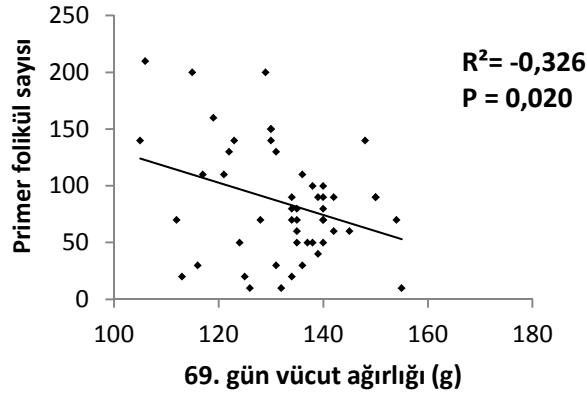
Şekil 4.17. Grupların puberteye ulaşma günü ile prepubertal (35. gün) vücut ağırlığı ilişkisi. (VO= Vajinal açıklık).



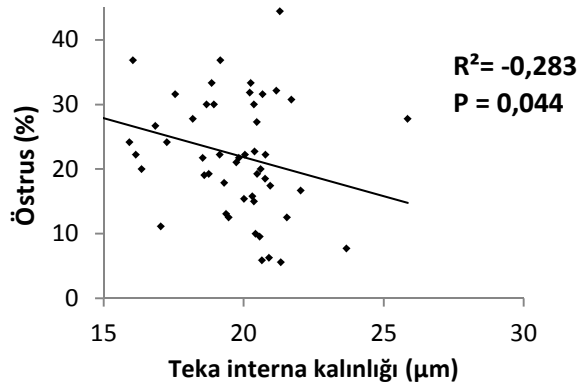
Şekil 4.18. Grupların östrus döngüsü uzunluğu ile serum NO miktarları ilişkisi.



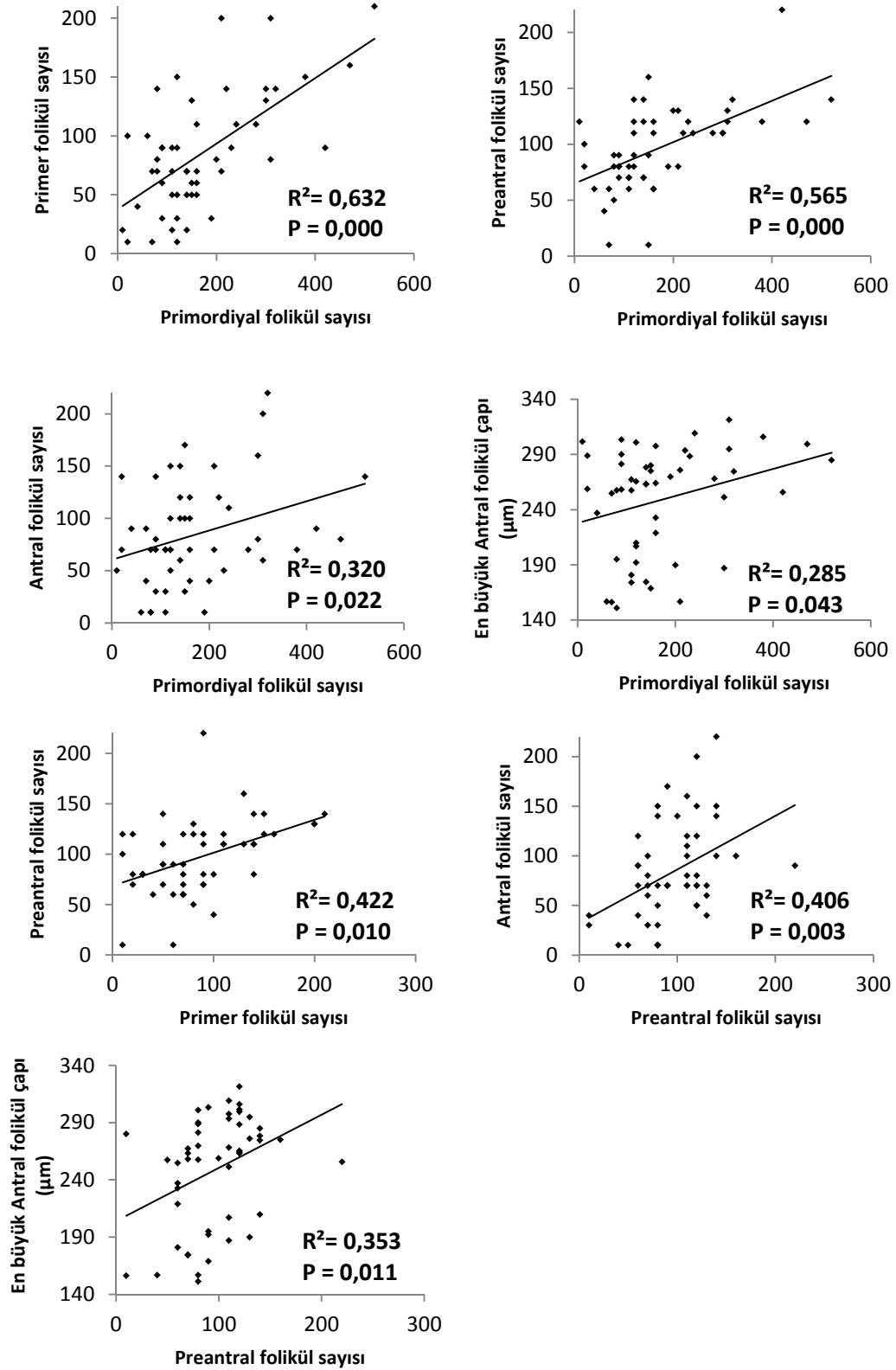
Şekil 4.19. Grupların primordiyal folikül sayısı ile 69. gün vücut ağırlıkları ilişkisi.



Şekil 4.20. Grupların primer folikül sayısı ile 69. gün vücut ağırlıkları ilişkisi.



Şekil 4.21. Grupların teka interna kalınlığı(µm) ile % östrus ilişkisi.



Şekil 4.22. Grupların ovaryan folikül sayılarının birbirleriyle ilişkileri.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, neonatal ve prepubertal dönemlerde bakteriyel endotoksinlere maruziyetin üremeyi uzun vadede negatif olarak etkilediği ve bu etkileşimde IL-1 β ve NO'nun aracı olarak rol oynadığı belirlenmiştir. Bu bağlamda, LPS uygulamalarının puberteyi geciktirdiği, ovaryumdaki primordiyal folikül sayısını azalttığı ve kanda anti-LPS antikorlarını artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulguların önemli bilimsel ve pratik katkılarının olabileceği düşünülmektedir.

5.1. LPS ve Puberte

Çalışmada vajinal açılmanın olduğu gün puberteye erişme süresi olarak ele alınmış ve genel olarak mevcut literatüre göre pubertenin geciktiği belirlenmiştir. Bu gecikme, LPS'nin puberteyi etkileme düzeyini daha belirgin olarak görebilmek için uygulanan kısa gün ışığı (8 saat aydınlık:16 saat karanlık) programının beklenen bir sonucudur (97). Gruplar kendi içlerinde incelendiğinde, tek LPS enjeksiyonu puberteye erişim süresini etkilemezken, neonatal dönemi müteakip prepubertal dönemde ikinci LPS enjeksiyonun yapılması puberteyi yaklaşık 5 gün kadar geciktirmiştir. Konu ile ilgili literatürler incelendiğinde esasen tek neonatal LPS enjeksiyonunun da puberteyi geciktirdiği belirlenmiştir (9, 64, 65). Bu tez çalışmasında tek LPS enjeksiyonun puberteye erişme süresini etkilememesi kullanılan endotoksinin türüne, serotipine, kullanılan deney hayvanının ırkına ve LPS'nin neonatal enjeksiyon gününe bağlı olabilir. Bizim çalışmamızdan farklı sonuçlar elde eden Walker ve ark. (2011) ile Wu ve ark. (2011) LPS enjeksiyonlarını postnatal 3-5. günlerde gerçekleştirmişlerdir. Yine Walker ve ark. (2011) *Salmonella enteriditis* LPS'si, Knox ve ark. (2009) ile Wu ve ark. (2011) ise *E. coli*'nin O55:B5 serotipini ve Sprague Dawley ırkını kullanmışlardır. Literatürde farklı LPS türleri ve serotiplerinin farklı inflamatuvar yanıtlar oluşturabileceği görülmektedir. Mihai ve ark. (2001) *Salmonella tphymurium* ile *E. coli*'nin farelerde TNF- α salınımını farklı etkilediğini tespit etmişlerdir. Akarsu ve ark. (2000) ise *E. coli*'nin değişik serotiplerinin sıçanlarda termoregulasyon mekanizmalarında farklı etkiler meydana

getirdiğini bulmuşlardır. Spencer ve ark. (2006) postnatal sıçanlara 7, 14, 21 ve 28. günlerde *E.coli* LPS'si enjekte ettikten sonra yetişkin dönemde tekrar LPS enjeksiyonu yaparak ateş yanıtı araştırmışlardır. Yapılan bu denemede ateş yanıtın postnatal 7. günde LPS enjekte edilen grupta en yüksek olduğu ve bu grupta erişkin ağırlığın da daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza göre tek LPS enjeksiyonu (7 veya 30. gün) puberteye erişme süresini etkilemezken iki LPS enjeksiyonu (7 ve 30. gün) puberteyi geciktirmiştir. Dolayısıyla üremeyi denetleyen sistem, bireyin mikroorganizmalara maruziyet sıklığını algılayarak bireyin yaşadığı ortam şartlarının üremeye elverişli olmadığı mesajını verebilir.

LPS'lerin etkilerine aracılık eden NO ve IL-1 β inhibitörlerinin kullanılması ise, hem neonatal hem de prepubertal dönemde iki defa LPS uygulansa dahi pubertenin gecikmesini engellemiştir. Bu da LPS'lerin üremeyi etkilemesinin NO ve IL-1 β yoluyla olabileceğini göstermektedir. Her iki inhibitör de aynı düzeyde koruyucu olmuşlardır. Dolayısıyla bakteriyel neonatal enfeksiyonlarda bu iki aracının inhibitörlerinin kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasının asıl amacı NO ve IL-1 β 'nin etkilerini bloke etmek olduğundan, bu blokerler LPS verilmeksizin yalnız başlarına enjekte edilmemişlerdir. Bu durumda, gözlenen etkiler LPS'nin etkileri bloke edildiğinden mi yoksa bu inhibitör maddelerin doğrudan etkilerinden mi kaynaklanmıştır sorusunun aydınlatılması gerekmektedir.

Tüm gruplarda puberteye ulaşma ağırlığının benzer olması, üreme sisteminin vücut ağırlığı ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada puberteye ulaşma süresi ile 35 ve 69. gün vücut ağırlıkları arasında pozitif bir ilişkinin olması bu bağlantının göstergesidir.

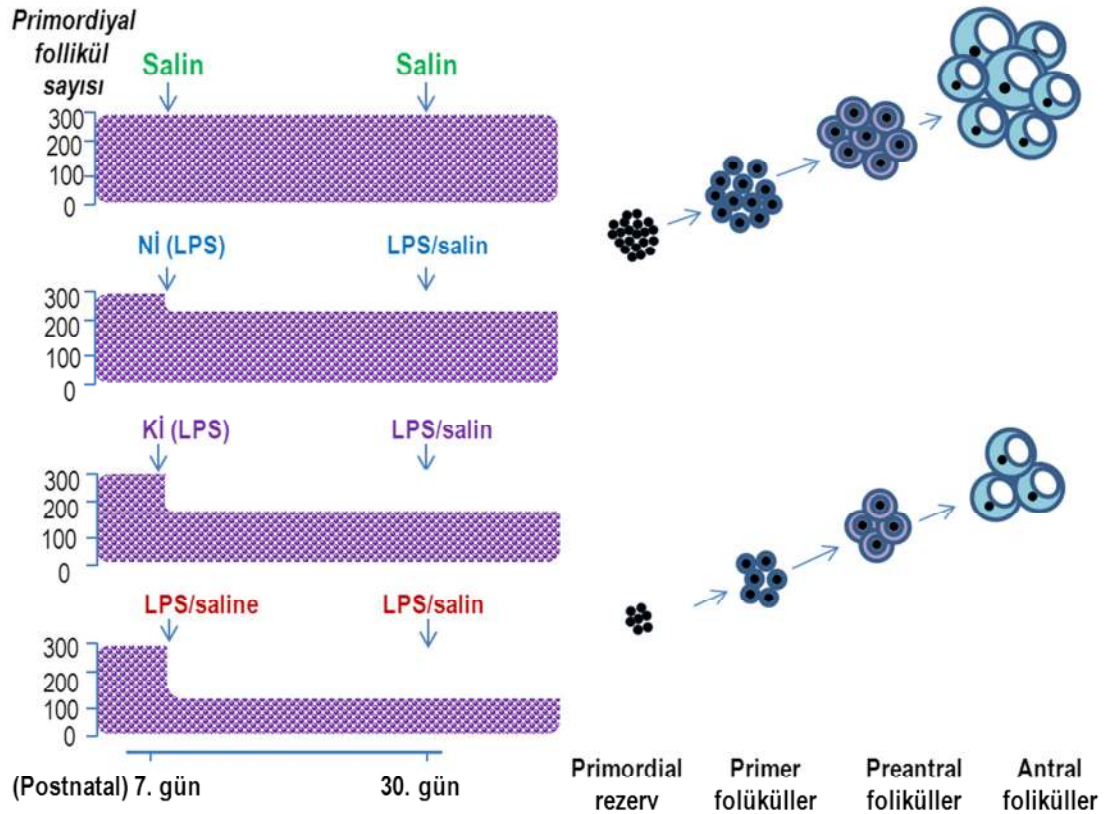
5.2. LPS ve Östrus Döngüsü

Puberteden hemen sonra yapılan östrus siklusu takiplerinde, tüm hayvanlarda düzensiz östrus siklusu görüldü. Bu bulgu ilk sikluslar için normal kabul edilebilir (100). Wu ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada kontrol grubunun östrus siklusunda normal düzen söz konusu iken neonatal LPS uygulanan gruplarda belirgin bir düzensizlik olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca birçok memeli türünde ilk siklusların

düzensiz olabileceği de bilinmektedir. Literatürde sıçanlarda da puberteye erişildikten sonraki ilk 15 günde östrus sikluslarının düzensiz olduğu tespit edilmiştir (100).

5.3. LPS ve Foliküler Gelişme

LPS'nin en belirgin etkilerinden birisi primordiyal foliküller üzerine görülmüştür. Kontrol grubunda primordiyal folikül rezervindeki folikül sayısı en yüksek düzeyde bulunmuşken, Nİ verilen sıçanlarda da LPS enjeksiyonlarına rağmen primordiyal folikül rezervindeki sayı fazlaca etkilenmemiştir. Buna mukabil, LPS enjeksiyonu yapılan gruplarda (7. ve/veya 30. günler) primordiyal folikül sayısı belirgin bir şekilde azalmış olup KI'nin ise bu azalmaya karşı koruyucu bir rolü belirlenememiştir. Dolayısıyla Şekil 5.1'in sol tarafında da özetlendiği gibi, iki ayrı primordiyal folikül rezervi oluşmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen folikül sayıları diğer literatürlerin kontrol gruplarıyla benzer bulunmuştur (65, 101). Primer, preantral ve antral foliküllerin sayısı ve en büyük antral folikülün çapının primordiyal folikül sayısı ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, primordiyal foliküller üzerine net azalma yapan LPS enjeksiyonlarının folikülogenezisin her aşamasını etkileme potansiyeli bulunmaktadır.



Şekil 5.1. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında sıçanlarda ovaryan foliküler gelişmenin hipotetik modeli (primordiyal folikül sayısı benzer olan gruplar beraber sunulmuştur, grup kısaltmaları için bkz. s.42).

Postnatal 7. ve 30 günlerde salin enjeksiyonları yapıldığında ovaryum üzerindeki primordiyal folikül sayısı yüksektir fakat aynı dönemlerde LPS enjeksiyonlarının yapılması primordiyal folikül sayısını azaltmaktadır. Postnatal 7. günde LPS ile birlikte Nİ uygulandığında primordiyal folikül sayısında yalnızca hafif bir azalma oluşmuşken; postnatal 7. günde LPS ile birlikte Kİ'nin uygulanması koruyucu olmamıştır (Şeklin sol tarafı).

Primordiyal folikül rezervi az sayıda olan sıçanlarda primer foliküller, preantral foliküller ve antral foliküller daha az sayıda olmakta ve aynı zamanda en büyük antral folikülün çapı da daha küçük olmaktadır (Şeklin sağ tarafı).

LPS enjeksiyonlarının primordiyal folikül sayısını azaltması iki nedenden ötürü olabilir: (1) Neonatal dönemde folikül sayısındaki artış LPS tarafından baskılanmış olabilir. Çünkü memelilerde doğum aşamasında tamamlanmış olan folikül sayısındaki artış, sıçanlarda doğumdan sonra da devam etmektedir. Bu her ne kadar olası bir neden gibi gözüксе de, normalde bu artış postnatal 3. günde tamamlandığı belirtilmiş olduğundan, tez çalışmasında postnatal 7. günde yapılan LPS enjeksiyonunun folikül sayısındaki artışı baskılaması düşük bir olasılıktır. (2) LPS enjeksiyonlarının primordiyal folikül sayısını azaltmasının bir diğer nedeni de apoptozise yol açarak foliküllerin ortadan kaldırılması olabilir. LPS'nin foliküller üzerine toksik etki yaparak apoptozise yol açmış olması daha muhtemel gözükmektedir. Bizim çalışmamızdan elde edilen veriler, bu toksik etkilerin minimize edilmesinde de sırasıyla NO ve IL-1 β inhibitörlerin etkin roller üstlendiklerini göstermektedir. Konu ile ilgili literatürler incelendiğinde lokal NO ve IL-1 β 'nin büyüyen antral folikülleri apoptozise karşı koruduğu bildirilmesine rağmen (102, 103) çalışmamızda incelediğimiz şekliyle genel bir yangı durumunda primordiyal foliküller üzerine etkileri bilinmemektedir. Ayrıca TNF- α artışı durumunda neonatal sıçanlarda primordiyal rezervin azaldığı tespit edilmiştir (104).

Bu çalışmada LPS+LPS enjeksiyonunun primordiyal folikül sayısında daha belirgin bir düşüşe neden olması beklenirken, Salin+LPS, LPS+Salin ve LPS+LPS enjeksiyonları primordiyal folikül sayılarını Salin+Salin grubuna göre aynı düzeyde azaltmışlardır. LPS+LPS grubunda, ikinci LPS enjeksiyonu yapıldığında, organizmanın ilk LPS enjeksiyonundan dolayı böyle bir strese hazırlıklı olduğu ve bu nedenle ikinci LPS'ye verilen yangısal yanıtın daha hafif geçirildiği düşünülebilir. Ellis ve ark. (2005) neonatal dönemde ve erişkinlik döneminde bu tez çalışmasına benzer şekilde sıçanlara Salin+Salin, Salin+LPS, LPS+Salin ve LPS+LPS enjeksiyonu yapmışlar ve ikinci enjeksiyondan 2 saat sonra TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve vücut ısısını ölçmüşlerdir. Söz konusu çalışmada, LPS+LPS grubunda Salin+LPS grubuna göre daha düşük TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve vücut ısısı yanıtı oluşurken daha yüksek kortikosteron salınımı belirlenmiştir. Bu tez çalışması literatürle birlikte ele alındığında, belirli bir zaman sonrasında yapılan ikinci LPS enjeksiyonları nedeniyle oluşan yangısal yanıtın, tek LPS enjeksiyonundan sonra oluşan yangıdan çok daha şiddetli olmayabileceğini göstermektedir. Her iki durumda da yapılan LPS

enjeksiyonları ile artış gösteren kortikosteron düzeyi, üremeyi negatif yönde programlayabilen bir etken olarak gözükmektedir (7, 8, 9). Bu tez çalışmasında ikinci LPS enjeksiyonu yapılan gruplarda (1) antikor yanıtının yüksek bulunması, yangının bu gruptaki hayvanlarda kontrol altına alınmış olabileceğini; (2) fakat ikinci LPS uygulamasıyla birlikte organizmaya ‘hastalık riski yüksek bir ortam’ sinyalinin verilerek pubertenin ötelenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada IL-1 β ve TNF- α düzeyleri incelenmiş fakat ölçülebilir düzeyin altında tespit edilmiştir. Ellis ve ark. (2005)’nın bizim araştırmamızın deney düzenine benzeyen çalışmasında da Salin+Salin ve LPS+Salin gruplarında bu iki sitokinin düzeyleri tespit edilebilir düzeyin altında bulunmuşken Salin+LPS ve LPS+LPS gruplarında ise LPS enjeksiyonlarını müteakip 2. saatte yapılan ölçümlerde IL-1 β ve TNF- α düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bu tez çalışmasında söz konusu ölçümler LPS enjeksiyonundan yaklaşık 45 gün sonra yapıldığı için bunların tespit edilebilir düzeyin altında bulunması olası gözükmektedir.

Öte yandan, LPS enjeksiyonları primordiyal folikül sayısını azaltmışken, primer, preantral ve antral folikül sayılarını etkilememiştir. Tez çalışmasında, ovaryan foliküller ikinci LPS’nin uygulanmasından yaklaşık olarak 45 gün sonra karakterize edilmiştir. Dolayısıyla, LPS’nin primordiyal folikül dışındaki foliküller üzerine yapmış olduğu negatif etkilerin izleri ortadan kalkmış olabilir. Çünkü primordiyal foliküller, genel olarak tümü aynı anda gelişmeyen ‘sessiz’ bir folikül rezervi oluştururlar ve her seferinde bu foliküllerden bir kısmı adanmış (committed) foliküllere dönüşerek ovulasyona ya da atreziye uğrarlar (22). Dolayısıyla, primordiyal folikül aşamasından sonraki tüm aşamalar aktif iken, primordiyal foliküller adanmış foliküller haline gelene kadar pasif bir şekilde ovaryum üzerinde bulunurlar. Bu nedenle de LPS’nin etkilerine bağlı olarak sayılarında meydana gelen azalma uzun bir süre sonra dahi tespit edilebilir. Primordiyal folikül rezervindeki folikül sayısının azalması rodentlerin yaşam döngüsü dikkate alındığında bir sıkıntı oluşturmazsa da, aynı bulgu insanlara uyarlanırsa, bunun foliküllerin tükenmesine bağlı olarak erken menopoza yol açma olasılığı düşünülebilir.

Primordiyal folikül rezervinin azalmasının puberteyi öne aldığına ilişkin kanıtlar olmasına rağmen (101, 106), Wu ve ark. (2011), neonatal dönemde LPS

enjekte ettikleri sıçanlarda primordiyal folikül sayısında azalma saptarken puberte gecikmesi saptamışlardır. Bu bulgu bizim çalışmamızdan elde edilen verilerle uyumludur. Dolayısıyla erken yaşlarda bakteriyel maruziyetin kişinin ileriki üreme aktivitesini negatif olarak programlaması muhtemel gözüküğünden konu ile ilgili yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Elde ettiğimiz bulgularda erişkin vücut ağırlığının (69. gün) artması primordiyal ve primer folikül sayısının azalmasına neden olmuştur. Bu durum, pubertenin vücut ağırlığıyla doğrudan ilişkisi olduğunu ve böylesi bir durumda folikülogenez aktivitesinde arttığını göstermektedir.

Çalışmamızda en büyük antral folikülün teka interna kalınlığı, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. LPS'nin sempatik tonusu artırarak teka interna kalınlığını artırdığına ilişkin kanıtlar vardır (65). Kronik aralıklı soğuk uygulaması ya da kısıtlanma stresinde teka interna kalınlığını artırarak folikülün ovulasyonuyla ilgili sorunlara yol açabilmekte ve polikistik overe neden olabilmektedir (107). Bir başka çalışmada ise polikistik overin önlenmesi sağlandığında teka kalınlığının normale döndüğü görülmüştür (108).

5.4. Anti-LPS antikorlu

Bu tez çalışmasıyla, *E.coli*'ye özgü anti-LPS antikorlarını tespit eden, duyarlı, basit ve hızlı bir ELISA testi geliştirilmiştir. Bu test sayesinde deney gruplarına yapılan LPS enjeksiyonlarının başarılı olduğu da kanıtlanmıştır. Böylece, LPS ile ilgili çalışmalar yapıldığında, bu antikorlar ölçülerek deneyin sağlıklı yürüdüğüne ilişkin önemli bilgiler kolay bir şekilde elde edilmiş olacaktır. Çünkü; LPS enjeksiyonları sonucunda, bu enjeksiyonların organizmada etki oluşturup oluşturmadığına ilişkin bulguların elde edilmesi oldukça güçtür. Ayrıca bu hayvanlardan kan alımı zor olduğu için genellikle hayvanların bir kısmının deneyden çıkarılması veya bu amaçla ek denemelerin yapılması gereksinimi doğmaktadır. LPS'lerin etkin olduğunun belirlenmesi amacıyla vücut ısısının ölçülmesi, sitokinlerin tayini vs. gibi spesifik olmayan ölçümler gerekmektedir. Bu tür parametrelerin ölçümleri hem zordur hem de pahalıdır. Geliştirilen test sayesinde

ileriki bir tarihte alınan numuneler kullanılarak LPS enjeksiyonlarının başarısı hakkında kesin, spesifik bilgiler elde edilebilecektir.

Çalışmamızda neonatal+prepubertal LPS enjeksiyonu yapılan her üç grupta da LPS'ye karşı spesifik antikor yanıtı gözlemlendi. Bu antikorların *E. coli* LPS'sine özgü oldukları düşünülmektedir. Çünkü *E. coli* LPS'si bağlanmayan solid faza deneklerin antikorları bağlanmamıştır. Öte yandan *E. coli* LPS'sini tanıyan ve bağlanan bu antikorların diğer LPS'lere karşı da çapraz reaksiyonlarının bulunması olasıdır. Fakat bizim çalışmamızdaki amaç anti-LPS antikorlarını tespit etmek olduğundan, geliştirilen testin bu soruya cevap verdiği görülmektedir. Bunun yanında prepubertal LPS enjeksiyonu yapılan SF+LPS grubundaki antikor yanıtı kontrole kıyasla yüksek buna mukabil çift LPS enjeksiyonu yapılan gruplardan ise daha düşüktü. Bu bulgu immünolojik yanıtın ikinci karşılaşmada güçlendiğini göstermektedir.

Anti-LPS antikoru ile puberte arasında bir ilişki saptanmamıştır. Çift LPS enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda antikor üretimi saptanmış ancak inhibitör uygulanan gruplarda puberte gecikmemiştir. Dolayısıyla, çift LPS enjeksiyonu, inhibitörler olmaksızın puberteyi geciktirdiği halde, bu gecikmeye aracılık eden faktörün ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Sonuç olarak söz konusu faktörün hipotalamusa doğrudan ya da dolaylı yollarla bilgi vermesi gerekir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. İki defa LPS uygulaması puberteyi geciktirmiştir.
2. İki defa LPS uygulamasında pubertenin gecikmesini IL-1 β ve NO inhibitörleri önlemiştir.
3. LPS'nin tek başına uygulandığı gruplarda foliküler gelişim ve özellikle de primordiyal rezerv azalmıştır.
4. Foliküler gelişimin azalması L-NAME ile önlenmiştir.
5. Foliküler gelişimin baskılanmasında IL-1 β inhibitörü yeterince etkili olmamıştır.
6. Vücut ağırlığı artıkça puberteye ulaşılan gün daha erken olmaktadır. Nitekim vücut ağırlığı arttıkça folikülogenez aktivitesi de hızlanmıştır.
7. Sıçanlarda *E.coli*'ye özgü anti-LPS antikorlarını tespit eden, duyarlı, basit ve hızlı bir ELISA testi geliştirilmiştir.

NO ve IL-1 β inhibitörlerinin, LPS'nin neden olduğu immünoreprodüktif programlamada üstlendikleri rolleri anlayabilmek adına bu moleküllerin tek başına ve farklı dozlardaki etkileri araştırılabilir. Ayrıca LPS ile olan etkileşimlerde kısa vadeli sonuçlarının araştırılması da bu konunun aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

İnsanlarda primordiyal folikül gelişimi fetal dönemde sonlandığından, sıçanlarda yapılacak denemeler konunun aydınlatılmasında önemli avantajlar sunmaktadır. Primordiyal foliküllerin henüz oluşumunu tamamlamadığı zaman diliminde (sıçanlarda ilk 3 gün) enjeksiyonların yapılarak LPS'nin hangi yollar aracılığıyla nasıl etkiler gösterdiği anlaşılabilir.

Farklı türde ya da serotipte LPS uygulamalarının tekrarlanarak bu programlamaya vereceği mesajın tespit edilmesi konunun biraz daha aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T. (2004). Commensal bacteria, mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93, 97-108.
2. Salyers AA, Shipman JA. (2001). *Getting in touch with your prokayotic self: mammal-microbe interactions*. Staley JT, Reysenbach AL. Editors. Section 11. Biodiversity of microbial life: Foundation of earth's biosphere. Newyork: Willey-Liss.
3. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 204- 211.
4. Koç E. (2005). Neonatal Sepsiste Etyopatogenezi. *Güncel pediatri dergisi*, 108-109.
5. Fink MP ve Heard SO. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock, *Journal of Surirgical Research*, 49, 186-196.
6. Spencer, S.J., Heida, J.G., Pittman, Q.J., (2005). Early life immune challenge effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behav. Brain Res.*, 164, 231–238.
7. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Shimizu, F., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, M. (2009). Neonatal immune challenge affects the regulation of estrus cyclicity and feeding behavior in female rats. *J. Dev. Neurosci.*, 27, 111–114.
8. Li XF, Kinsey-Jones JS, Knox AM, Wu XQ, Tahsinsoy D, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. (2007). Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology*, 148(12), 5984-90.
9. Walker A.K., Hiles SA, Sominsky L., McLaughlin EA., Hodgson DM. (2011). Neonatal lipopolysaccharide exposure impairs sexual development and reproductive success in the Wistar rat. *Brain Behavior and Immunity*, 10.1016.

10. Shanks, N., Windle, R.J., Perks, P.A., Harbuz, M.S., Jessop, D.S., Ingram, C.D., Lightmen, S.L. (2000). Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 5645–5650.
11. Rivier C, Vale W. (1990). Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology*, 127, 849-856.
12. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. (2005). Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 76, 1–18.
13. Watanobe, H., Yoneda, M., (2003). A mechanism underlying the sexually dimorphic ACTH response to lipopolysaccharide in rats: sex steroid modulation of cytokine binding sites in the hypothalamus. *J. Physiol*, 547, 221–232.
14. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, and Dinarello CA. (1998). Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1 β -converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood*, 91, 2118–2125.
15. Staci D. B., Joseph C. B., Andre D.A., Linda R.W., Jerry W. R., Steven F.M. (2005). Neonatal Infection-Induced Memory Impairment after Lipopolysaccharide in Adulthood Is Prevented via Caspase-1 Inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 25(35), 8000–8009.
16. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120, 227-37.
17. Uzbay IT, Lal H. (2002). Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, 7-nitro indazole, and agmatine on pentylenetetrazol-induced discriminative stimulus in Long-Evans rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26, 567-73.
18. Türköz Y, Özerol E. (1997) Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Roller. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 4(4).
19. Cemil T. (2002). Fokal serebral İskemide Nitrik Oksitin Rolü. *Dicle Tıp Dergisi*, 29, 3.
20. Roxana R., Osvaldo P., Nancy C., Berta S., Silvia C., Jaime M., Pablo S. (2008). Effect of Bacterial Lipopolysaccharide on the Reproductive Axis of Prepubertal and Peripubertal Female Rats, *Neuroimmunomodulation*, 15, 125-130.

21. Çelik Ö., Yıldırım A. (2010). Folikülogenezisin Moleküler Temelleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17 (1) 59-63, Derleme.
22. Elizabeth A. M., Aron J. W. H. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214.
23. Snell GD. (1956). Reproduction. (Snell GD, Biology of Mouse). USA: 2. baskı. Dover Publications, 55-89.
24. Champlin A.K., Dorr D.L. (1973). Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod*, 8, 491-4.
25. Rao R.P, Kaliwal B.B. (2002). Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health*, 40, 237-44.
26. Stockard CR, Papanicolaou GN. (1917). The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig: with a study of its histological and physiological changes. *Amer J Anat*, 22, 225-283.
27. Nelson J.F, Felicio L.S, Randall P.K, Sims C, Finch C. H. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. *Biol Reprod*, 27, 327-39.
28. Hubscher C.H, Brooks D.L, Johnson J.R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem*, 80 (2), 79-87.
29. Thrasher J.D. , Clark F.I. , Clarke D.R. (1967). Changes in the vaginal epithelial cell cycle in relation to events of the estrous cycle. *Exp Cell Res*, 45(1), 232-6.
30. Sehaberg E S. (1992). Artificial intelligence in automated classification of ral vaginal smear cells. *Analyt Quant Cytol Histol*, 14,446-450.
31. Scherer K. (1993). Trachtigkeitsdiagnose bei Kaninchen Meerschweinchen und Ratte. Tierarztl Prax. *Sonderheft*, 63-64.
32. Dennis F, Kohn SWB. (1984). *Laboratory Animal Medicine*. Biology and Diseases of Rats. Academic Press Inc Florida, p. 91-120.
33. Havenaar R, Meijer JC, Morton DB. (1993). Biology and Husbandry of Laboratory Animals. Principles of Laboratory Animal Science. *Elsevier Co Amsterdam*, P 17-75.
34. Westwood FR. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, 36, 375-384.

35. J. S. Kinsey-Jones, X. F. Li, A. M. I. Knox, Y. S. Lin, S. R. Milligan, S. L. Lightman and K. T. O'Byrne. (2010). Corticotrophin-Releasing Factor Alters the Timing of Puberty in the Female Rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 102–109.
36. Daniel JA, Abrams MS, Souza L, Wagner CG, Whitlock BK, Sartin JL. (2003). Endotoxin inhibition of luteinizing hormone in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 25 13-19.
37. Gündüz B. (2002). Effects of Photoperiod and Temperature on Growth and Reproductive Organ Mass in Adult Male Mongolian Gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Turk J Biol*, 26, 77-82.
38. Faith RE, Hessler JR. (2006). Housing and environment. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The laboratory rat*. Academic Press, p.314-15.
39. C. Rivier. (1995). Influence of immune signals on the hypothalamic-pituitary axis of the rodent, *Front. Neuroendocrinol*, 16, 151–182.
40. Melmed, S. (2001). The immuno-neuroendocrine interface. *J. Clin. Invest.*, 108, 1563–1566.
41. Walker AK, Nakamura T, Hodgson DM. (2009). Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. Informa Healthcare USA, Inc. Stress, Early Online:1–10.
42. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, 81(6), 1025-32. Review.
43. Battaglia, D.F., Krasa, H.B., Padmanabhan, V., Viguié, C., Karsch, F.J. (2000). Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol. Reprod.*, 62, 45–53.
44. Ma XC, Chen LT, Oliver J, Horvath E, Phelps CP. (2000). Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin. *Brain Res*, 861(1), 135-42.
45. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U ve diğerleri. (1996). Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Pathology of Septic Shock*. Berlin, *Springer-Verlag*. S:40–81.

46. İskit AB.. (2005). Sepsiste Deneysel Modeller, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, *Yoğun Bakım Dergisi*, 5(2), 133-136.
47. Brandtzaeg P. (1996). Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*. 216, 15-37.
48. Caroff M, Karibian D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*, 338(23), 2431–2447.
49. Azap A., Tekeli M. (2002). Sepsis sendromu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, *Güncel Gastroenteroloji*, 6/3.
50. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H J. (2010). Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *Neurochem*. 114(1),13-27. Review.
51. Mihai G. N., Bart J.K., Leo A.B.J., Tom S., Ineke V., Otto C. B ve diğerleri. (2001). Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur. J. Immunol.*, 31, 2529–2538.
52. Davies M.G, Hagen P.O. (1997). Systemic inflammatory response syndrome. *Bri J Surg*, 84(7), 920–935.
53. Schönbeck U, Brandt E, Petersen F, Flad H.D, Loppnow H. (1995). Interleukin-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. *J Immunol*, 154, 2375–2883.
54. Hardaway RM. (2000). Rewiew of septic shock. *The Amercan Surgeon*, 66(1), 22-29.
55. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-983.
56. Agnese DM, Calvano JE, Hahm S, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. (2002). Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphism are associated with an increased risk of gram- negative infections. *J Infect Dis*, 186, 1522-1525.
57. Chen XM, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, Limper AH, Larusso NF. (2005). Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense response to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kB. *J Immunol*, 175, 7447-7456.

58. Tizard IR. (2004). *Veterinary Immunology: An Introduction*. 7th Edition, Saunders, pp. 293-299.
59. Tosi MF. (2005). Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 116 (2), 241-249.
60. Akça A, Gökçe Hİ. (2007). *İmmuniteye Genel Bakış ve Paraziter Hastalıklarda İmmunite, Tıbbi ve Veteriner Immunoparazitoloji*. Türkiye: Parazitoloji Derneği Yayınları, pp. 430-431.
61. Kohman RA, Tarr AJ, Sparkman NL, Bogale TM, Boehm GW. (2008). Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1 β gene transcription in adulthood. *Behav Brain Res*, 194(1), 25-31.
62. Watanobe H., Hayakawa Y. (2003). Hypothalamic Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-, But Not Interleukin-6, Mediate the Endotoxin-Induced Suppression of the Reproductive Axis in Rats. *Endocrinology*, 144(11), 4868–4875.
63. Iwasa T, Matsuzaki T., Murakami M. Kinouchi R., Ogata R. (2009). Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *Neuroscience*, 27, 345–349.
64. Knox AM, Li XF, Kinsey-Jones JS, Wilkinson ES, Wu XQ ve diğerleri. (2009). Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the female rat. *J Neuroendocrinol*, 21(8), 683-9.
65. Wu XQ., Li XF, Ye B., Popat N., Milligan SR. ve diğerleri. (2011). Neonatal programming by immunological challenge: effects on ovarian function in the adult rat. *Reproduction*, 1741-7899.
66. Shanks N., Larocque S., Meaney MJ. (1995). Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *The journal of neuroscience*, 15(1), 376-384.
67. Turnbull AV, Rivier C. (1997). Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology*, 138(3), 1008-13.

68. Sergeyev V, Broberger C, Hökfelt T. (2001). Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, 90(2), 93-100.
69. Walker FR, March J, Hodgson DM. (2004). Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. *Behav Brain Res*, 154(1), 63-9.
70. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cytokines. In: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. (Eds.). (2000). *Kuby Immunology*, 4. baskı W.H. Freeman and Company, 303-327.
71. Dinarello CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-2147.
72. Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 19, 615-655.
73. Levi M, Van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJH. (1997). The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanism in sepsis and endotoxaemia. *European Journal of clinical investigation*, 27, 3-9.
74. Tilders F.J.H, R.H. DeRijk, A.M. Van Dam, V.A.M. Vincent, K. Shotanus, J.H.A. (1994). Persoons, Activation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology*, 19, 209–232.
75. Nappi RE, Rivest S. (1997). Effect of immune and metabolic challenges on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in cycling female rats: an evaluation at the transcriptional level. *Endocrinology*, 138, 1374–1384.
76. Kang SS, Kim SR, Leonhardt S, Jarry H, Wuttke W, Kim K. (2000). Effect of interleukin-1 on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *J Neuroendocrinol*, 12, 421–429.
77. Chauvier D., Lecoœur H., Langonne A., Borgne-Sanchez A., Mariani J., Martinou J. C., Rebouillat D. and Jacotot E. (2005). Upstream control of apoptosis by caspase-2 in serum-deprived primary neurons. *Apoptosis* 10, 1243–1249.
78. Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-42.

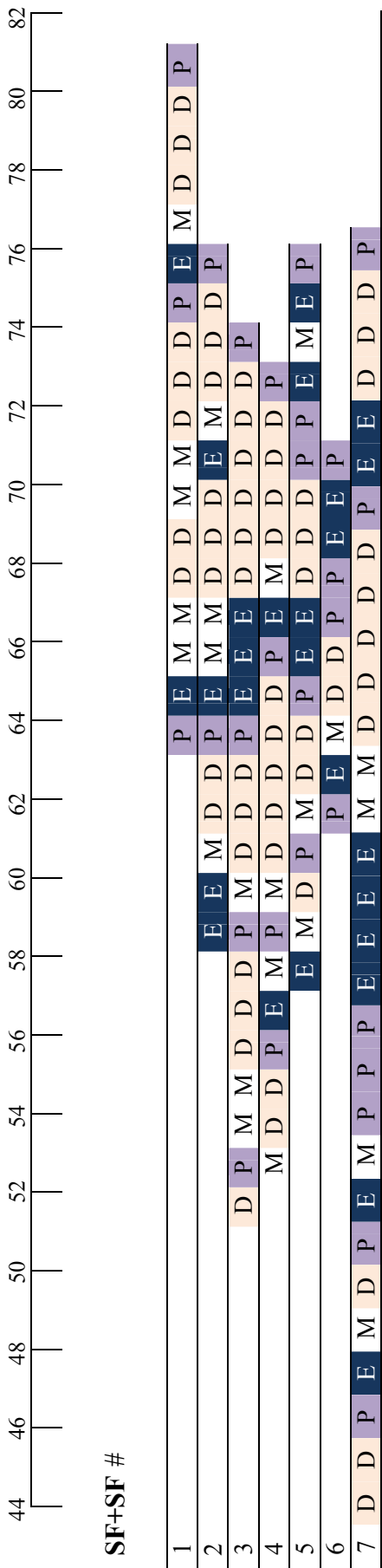
79. Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF. (1990). Tumor necrosis factor inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology*, 127, 101–106.
80. Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2006). Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, 147, 562–570.
81. Moncada S, Higgs A. (2002). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.*, 993, 329(27).
82. Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. (2006). Development of Genetically Engineered Mice Lacking All Three Nitric Oxide Synthases. *J Pharmacol Sci.*, 102(2), 147-154.
83. Kigwell BA. (2000). Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effect of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.*, 14, 1685-1696.
84. Cekmen MB, Turgut M, Turkoz Y, Aygun AD, Gozukara EM. (2001). Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)’ın Fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin J Pediatr*, 10, 226-235.
85. Uemura Y, Kowall NW, Beal MF. (1990). Selective sparing of NADPH-diaphrase-somatostatin-neuropeptide Y in ischemic gebril striatum. 27, 620-625.
86. Wei X, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GS, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375, 408.
87. Karaböcüoğlu M. (1999). Sepsis ve septik şok tedavisinde nitrik oksitin rolü. *Ankem Derg*, 13, 380-385.
88. Billiar TR, Curran R D, Hardrecht B G, Stuehr D J, Dmetris A J, Simmons R L. (1990). Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N- monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukocyte Biol*, 48, 565.
89. Lawand N B, Willis W D, Westlund K N. (1997). Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroreport*, 8, 895.

90. Tunçtan B. (2005). *Nitrik oksit miktarlarının Griess yöntemi ile ölçülmesi*. Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Eğitim Sempozyumu: Nitrik oksit Farmakolojisi Seminer Özeti,(s.61).
91. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 101, 746–752.
92. Renolleau S, Fau S, Goyenvallé C, Joly LM, Chauvier D, Jacotot E, Mariani J, Charriaut-Marlangue C. (2007). Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *J Neurochem*, 100(4), 1062-71.
93. Guyton A.C., Hall J.E. *Textbook of medical physiology*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
94. ELISA yöntemleri. Erişim 1 Aralık 2011, <http://www.piercenet.com/browse.cfm?ID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>.
95. Cocks, T. M., Angus, J. A., Campbell, J. H., Campbell, G. R. (1985) Release and properties of endotheliumderived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J. Cell Physiol.*, 123, 310– 320.
96. Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C. and Henderson, A. H. (1984) The nature of endotheliumderived vascular relaxant factor. *Nature*, 308, 645– 647.
97. Phyllis G. Johnston, Irving Z.. (1979). Photoperiodic Influences on Gonadal Development and Maintenance in the Cotton Rat, *Sigmodon hispidus*. *Biology of Reproduction*, 21, 1-8.
98. Akarsu E.S. (2000). Lipopolisakkarid ve komponentlerinin sıçanda termoregülasyon üzerine olan etkileri ve etki mekanizmaları (1881). Ankara. TÜBİTAK-SBAG.
99. Spencer S.J., Martin S., Mouihate A., Pittman Q. J. (2006). Early-Life Immune Challenge: Defining a Critical Window for Effects on Adult Responses to Immune Challenge. *Neuropsychopharmacology*, 31, 1910-1918.
100. Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Schmid J, Cooper RL. (2000). The effects of atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci.*, 58(2), 366-76.

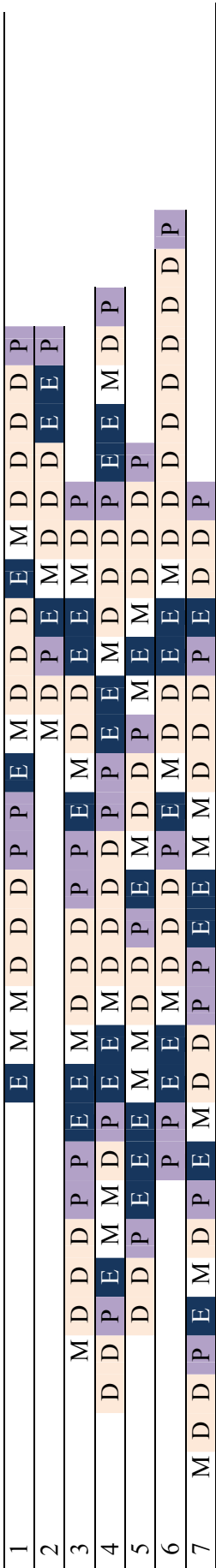
101. Zarate R.S., Dorfman M, Paredes A., Lara H.E. (2008). Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biology of reproduction*, 78, 673-680.
102. Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1), 23-30. Review.
103. Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJW. (1995). Interleukin-1 β suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*, 136, 3120–3127
104. Marcinkiewicz JL, Balchak SK, Morrison LJ. (2002). The involvement of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an intraovarian regulator of oocyte apoptosis in the neonatal rat. *Front Biosci.*, 1,7, Review.
105. Ellis S., Mouihate A., Pittman Q.J. (2005). Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. *The FASEB Journal*, 10.1096/ 04-3569.
106. Shirota M., Soda S., Katoh C., Asai S., Sato M. ve diğerleri. (2003). Effects of reproduction of the number to achieve puberty in female rats. *Reproduction*, 125, 85-94.
107. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL & Lara HE. (2003). Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 68, 2038–2043.
108. Alexander CJ, Tangchitnob EP, Lepor NE. (2009). Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Obstet Gynecol. Fall*, 2(4), 232-9.

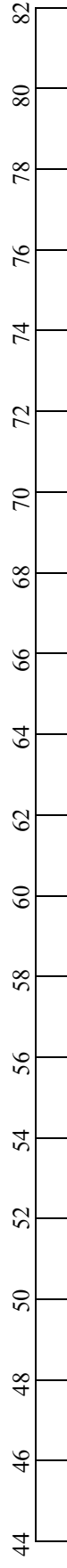
EKLER

Ek 1. Grupların östrus siklusları (#= Sıçan no, P= Proöstrus, E= Östrus, M= Metöstrus, D= Diöstrus)



SF+LPS#





LPS+SF #

1		D	D	D	P	P	E	E	M	E	E	E	E	E	D	D	D	E	E	E	M	D	D	P	E	M	D	P			
2		M			M	D	D	D	P	P	E	E	M	M	D	D	P	E	M	M	D	D	D	P	E	E	M	D	P		
3		M	M	D	D	D	P	P	E	M	M	D	D	D	E	E	M	D	D	P	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	P
4						P	M	M	D	P	E	M	D	D	P	E	M	D	D	D	D	P	E	M	D	D	D	P			
5					D	D	P	P	E	E	E	M	M	D	D	P	E	E	M	D	D	P	E	M	D	D	D	P			
6					E			D	P	E	E	M	M	D	D	D	D	E	D	D	D	P	E	M	D	D	P				
7		E			M	D	D	D	P	E	M	E	E	M	D	P	E	M	D	P											
8		P			E	M	M	D	D	P	E	M	D	E	M	D	D	D	D	P											
9								E			E	M	D	D	D	P	P	E	E	M	D	D	P	E	M	D	P				

LPS+LPS #

1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Ek 2. Etik Kurul Raporu

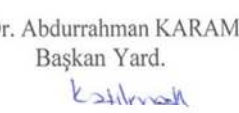
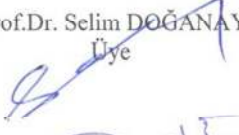
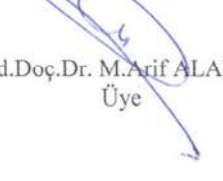


İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 06-07-2010
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2010/54
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☐ E ☒ D ☐ Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 80 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : Neonatal / 5-10 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Sedat YILDIZ'ın yürütücüsü olduğu "**Neonatal LPS uygulaması ve üremenin uzun vadeli programlanması: NOS ve Kaspaz-1 inhibitörlerinin rolü**" isimli 2010/54 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

 Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard. <i>katılmak</i>	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör <i>katılmadı</i>
 Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye	 Yrd.Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye	

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Şanlıurfa’da doğdum. 2005 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimime başladım ve 2009 yılında buradan mezun oldum. 2009 yılı güz döneminde İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2011 yılında aynı bölüme Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen bu görevime devam etmekteyim.