

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Annelerden Doğan
Yenidoğan Beynindeki İnflamazom Aktivasyonunun
İncelenmesi**

Dr. F. Sıla SOY HALAÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
İZMİR - 2022

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Annelerden Doğan
Yenidoğan Beynindeki İnflamazom Aktivasyonunun
İncelenmesi**

Dr. F. Sıla SOY HALAÇ

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Ülker CANKURT
İkinci Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Serap CİLAKEK
MIÇILI

İçindekiler Tablosu

TABLO DİZİNİ	iii
RESİM DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
GRAFİK DİZİNİ	vi
FİĞÜR DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ	x
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Santral Sinir Sistemi Embriyolojisi ve Anatomisi	1
1.2. Serebrum Histolojisi	2
1.2.1. Substantia Grisea	2
1.2.2. Substantia Alba	4
1.3. Serebral Korteks Hücreleri	4
1.3.1. Nöronlar	5
1.3.2. Mikroglia	6
1.3.3. Astrositler	12
1.3.4. Oligodendrositler	12
1.4. Hipokampus	13
1.5. Prefrontal korteks	14
1.6. Yüksek yağlı diyet ve Obezite	15
1.7. Omega 3 ve Omega 6 Yağ Asitleri	17
1.8. Maternal beslenme ve yavruya etkisi	18

1.9.	NLRP3 İnflamazom Yolağı	20
1.10.	Nöroinflamasyon	22
2.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
2.1.	Araştırmanın Tipi	23
2.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
2.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	24
2.4.	Çalışma Materyali	27
2.5.	Araştırmanın Değişkenleri	28
2.6.	Veri Toplama Araçları	28
2.7.	İstatistiksel Analiz	35
2.8.	Etik Kurul Onayı	35
3.	BULGULAR	36
3.1.	Yavru Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması	36
3.2.	Yavru Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması	40
3.3.	PN7 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları	41
3.4.	PN28 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları	46
3.5.	İmmünohistokimyasal Bulgular	49
4.	TARTIŞMA	91
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	98
6.	KAYNAKÇA	101

TABLO DİZİNİ

Tablo 1	: Araştırma Planı
Tablo 2	: Kullanılan Cihazlar
Tablo 3	: Doku Takibi Protokolü
Tablo 4	: Krezil Viyole Boyama Protokolü
Tablo 5	: İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü
Tablo 6	: Yavru Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması
Tablo 7	: Yavru Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması
Tablo 8	: PN7 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları
Tablo 9	: PN28 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları

RESİM DİZİNİ

- Resim 1 : A. Neokorteksin sitoarkitektürel tabakaları B. Substantia Alba
- Resim 2 : Santral sinir sisteminde yer alan çeşitli piramidal ve granüler nöronlar
- Resim 3 : Astrositler ve Oligodendrositler
- Resim 4 : Rat hipokampusü
- Resim 5 : DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD yem grupları ve her biri ayrı kafeste tutulan dişi fareler
- Resim 6 : PN7 fare yavruları
- Resim 7 : Sakrifikasyon sonrası beyin dokularının görünümü

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1 : Mikroglia ve diğer SSS hücrelerinin embriyonik dönem gelişim şeması
- Şekil 2 : Mikroglia ve diğer SSS hücreleri arasındaki etkileşim
- Şekil 3 : Doymuş yağ asitleri(SFA) ile Tekli doymamış(MUFA) ve Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)
- Şekil 4 : NLRP3 İnflamazomu Aktivasyon Yolakları



GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1	: PN0 yavru vücut ağırlıkları
Grafik 2	: PN7 yavru vücut ağırlıkları
Grafik 3	: PN28 yavru vücut ağırlıkları
Grafik 4	: PN7 yavru beyin ağırlıkları
Grafik 5	: PN28 yavru beyin ağırlıkları
Grafik 6	: PN7 Prefrontal Korteks nöron sayımı
Grafik 7	: PN7 Hipokampus nöron sayımı
Grafik 8	: PN28 Prefrontal Korteks nöron sayımı
Grafik 9	: PN28 Hipokampus nöron sayımı
Grafik 10	: PN7 Prefrontal Korteks NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 11	: PN7 Prefrontal Korteks Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 12	: PN7 Prefrontal Korteks IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 13	: PN7 Prefrontal Korteks Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 14	: PN7 Hipokampus NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 15	: PN7 Hipokampus Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 16	: PN7 Hipokampus IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 17	: PN7 Hipokampus Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 18	: PN28 Prefrontal Korteks NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 19	: PN28 Prefrontal Korteks Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 20	: PN28 Prefrontal Korteks IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 21	: PN28 Prefrontal Korteks Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 22	: PN28 Hipokampus NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 23	: PN28 Hipokampus Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 24	: PN28 Hipokampus IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları
Grafik 25	: PN28 Hipokampus Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları

FIGÜR DİZİNİ

Figür 1	: PN7 Prefrontal Korteks Krezil Viyole
Figür 2	: PN7 Hipokampus Krezil Viyole
Figür 3	: PN28 Hipokampus Krezil Viyole
Figür 4	: PN7 Prefrontal Korteks NLRP3 ve Kaspaz-1
Figür 5	: PN7 Prefrontal Korteks IL1 β ve Iba1
Figür 6	: PN7 Hipokampus NLRP3
Figür 7	: PN7 Hipokampus Kaspaz-1
Figür 8	: PN7 Hipokampus IL1 β
Figür 9	: PN7 Hipokampus Iba1
Figür 10	: PN28 Prefrontal Korteks NLRP3
Figür 11	: PN28 Prefrontal Korteks Kaspaz-1
Figür 12	: PN28 Prefrontal Korteks IL1 β
Figür 13	: PN28 Prefrontal Korteks Iba1
Figür 14	: PN28 Hipokampus NLRP3
Figür 15	: PN28 Hipokampus Kaspaz-1
Figür 16	: PN28 Hipokampus IL1 β
Figür 17	: PN28 Hipokampus Iba1

KISALTMALAR

SSS : Santral Sinir Sistemi

DYA : Doymuş yağ asitleri

PUFA : Poliansature yağ asitleri

MUFA : Monoansature yağ asitleri

YYD : Yüksek yağlı diyet

LPS : Lipopolisakkarit

CA : Kornu ammonis

GD : Girus dentatus

IL1 β : İnterlökin 1 beta

O3 : Omega 3

O6 : Omega 6

PN : Postnatal

E: Embriyonik

NLR: Nod like receptor

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji alanında tıpta uzmanlık eğitimim ve tez yazma sürecimde tecrübelerini ve bilgi birikimini benimle paylaşan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen ve desteğiyle tez yazma sürecimi kolaylaştıran danışman hocam sayın Prof. Dr. Ülker CANKURT'a

Asistanlık eğitimim boyunca ilk andan son ana kadar tüm eğitim ve mesleki yeterliliğimi borçlu olduğum, her daim desteğini hissettiğim ,tezim için en az benim kadar emek veren değerli hocam Doç. Dr. Serap CİLAKER MIÇILI'ya

İlk danışman hocam ve emekli olduğu güne kadar asistanı olmaktan gurur duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Kazım TUĞYAN'a

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının çok değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Güven ERBİL , Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Başak BAYKARA ve emekli oldukları güne kadar asistanlık eğitimime çok değerli katkılarını sunan Prof. Dr.Bekir ERGÜR, Prof. Dr. Işıl TEKMEKİ'e uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca mesleki gelişimimdeki katkıları nedeniyle, Uzmanlık eğitimim boyunca çok güzel geçen asistanlık sürecimin en önemli destekçileri iyi ki varlar dediğim çok değerli meslektaşlarım Dr. Gözde ERKUL, Dr. Tuba PERİ , Dr. Ali Rıza KARABULUT, Dr.Gizem AKIN'a

Mesleki bilgilerini her daim benimle paylaşan tanımaktan, hayatıma verdiği katkılardan ötürü çok mutlu olduğum değerli çalışma arkadaşım Selma AYDEMİR'e,

Bana her zaman destek olan değerli çalışma arkadaşlarım Nevin ERSOY , Dr. Meltem AKINCI, Dr. Özcan SARBAT, Dr. Melek Yeşim AK , Burcu BARAN, Gökçen BİLİCİ ve Şeyda DEMİR'e Tüm hayatım boyunca en büyük destekçim sevgileri ile her zaman yanımda olan ve onlar sayesinde uzman hekim olabildiğim canım ailem, babam Abdullah SOY,annem Leyla SOY ve bir tanecik kardeşim, meslektaşım Op.Dr. Furkan SOY 'a

Elimden tuttuğu her gün daha da güçlü hissettiğim , uzmanlık ve tez süresinde her şeyi onun sayesinde ve beraber başardığım, bundan sonra da en güzel başarıları beraber kazanacağımıza emin olmamı sağlayan hayat arkadaşım çok değerli eşim ,meslektaşım Dr. Eren HALAÇ'a

Teşekkür ederim..

TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje ID:2772 Proje başlama tarihi: 26.07.2022



Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Annelerden Doğan Yenidoğan Beynindeki İnflamazom Aktivasyonunun İncelenmesi

F. SILA SOY HALAÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Balçova, İzmir, sila.soy@deu.edu.tr

ÖZET

Amaç :

Vücutta farklı inflamatuvar yollar inflamasyonu tetiklemektedir. Bunlardan biri de NLRP3 inflamazom aktivasyonudur. Yüksek yağlı diyet ile beslenmenin sonucu olarak farklı dokularda NLRP3 inflamazomunun aktive olduğu gösterilmekle birlikte ; annenin gebelikte ve emzirme sürecinde yüksek yağlı diyetle beslenmesinin yavrunun beyninde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyip tetiklemediği bilinmemektedir. Çalışmamızda farklı yağ asidi kompozisyonuna sahip yüksek yağlı diyet ile beslenen dişi farelerden doğan yavru fare beyinlerindeki NLRP3 inflamazom aktivasyonunu göstermeyi amaçladık.

Yöntem:

Çalışmamız 5 gruptan oluşmaktadır. Anneler katımdan 3 hafta öncesine kadar kendi yem grupları ile beslenmiştir. 2 gruptaki dişi fareler standart kontrol yemi ile; diğer 3 gruptaki dişi fareler ise diyetten gelen enerjinin %50 sinin yağdan geldiği yüksek yağlı diyet ile beslenmiştir. Kontrol diyeti ile beslenen annelerden doğan bir grup fare yavrusuna ise pozitif kontrol amacı ile PN4.-6. günlerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu yaptığı bilinen LPS enjeksiyonu yapılmıştır. Her grup için C57BL/6 türü 4 adet dişi fare olmak üzere toplamda 20 adet dişi fare ve bu annelerden doğan her grup için PN7. günde 7 adet, PN28. günde 7 olmak üzere toplamda 70 fare yavrusu ile çalışılmıştır.

Bulgular:

Sakrifiye edilen yavru fare beyinleri değerlendirildiğinde LPS enjeksiyonu yapılan gruptaki yavru farelerde 7. ve 28. günde hem hipokampus hem de prefrontal korteks nöron yoğunluğunun

azaldığı; NLRP3 inflamazom aktivasyonunun olduğu görüldü. Hem PN7 hem de PN28 de ise nöron yoğunluğu özellikle DYA-YYD grubunda etkleniyor gibi görünmektedir. PN7 de yüksek yağlı diyet gruplarında prefrontal kortekste NLRP3 aktivasyonu belirgin değilken; mikroglial aktivasyon belirgindi. Öte yandan PN7 de hipokampüste yine özellikle DYA-YYD grubu için NLRP3 inflamazom aktivasyonu belirgindi. PN28 için ise hem DYA-YYD hem de O6/O3:20/1-YYD gruplarında hem prefrontal kortekste hem de hipokampüste NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve mikroglial aktivasyon belirgindi. O6/O3:2/1-YYD grubundaki yüksek Omega3 seviyesinin inflamazom aktivasyonunu geriletici etkisi görüldü.

Sonuç :

Annenin gebelik ve laktasyon sürecinde yüksek yağlı diyet ile beslenmesi, beyinde mikroglia ve NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nöroinflamasyon, mikroglia , NLRP3, yenidoğan , hipokampus, prefrontal korteks

Investigation of Inflammasome Activation in Neonatal Brain Born to High-Fat Dieted Dams

F. SILA SOY HALAÇ

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology,
Balçova, İzmir, sila.soy@deu.edu.tr

ABSTRACT

Aim :

Different inflammatory pathways in the body trigger inflammation. One of them is the activation of NLRP3 inflammasome. Although it has been shown that NLRP3 inflammasome is activated in different tissues as a result of feeding with a high-fat diet; it is not known whether feeding the dam with a high-fat diet during pregnancy and lactation triggers NLRP3 inflammasome activation in the offspring's brain. In our study, we aimed to demonstrate the activation of NLRP3 inflammasome in offsprings' brains born from mice fed a high-fat diet with different fatty acid composition.

Method:

Our study consists of 5 groups. Dams were fed with their own feed groups until 3 weeks before mating. Female mice in 2 groups were fed with standard control chow; female mice in the other 3 groups were fed a high-fat diet in which 50% of the energy from the diet came from fat. A group of mouse pups born from dams fed a control diet were injected with LPS, which is known to activate NLRP3 inflammasome on days PN4-6, as a positive control. For each group, a total of 20 female mice, including 4 females of the C57BL/6 type, and for each group born from these dams, a total of 70 mouse pups were studied, 7 on PN7 day and 7 on PN28 day.

Results:

When the sacrificed pups brains were evaluated, it was found that both hippocampus and prefrontal cortex neuron density decreased in the pups in the LPS injection group on the 7th and 28th days; NLRP3 inflammasome activation was observed. In both PN7 and PN28, neuron density seems to be affected especially in the SFA-HFD group. In PN7, while NLRP3 activation in the prefrontal cortex was not significant in high-fat diet groups; microglial activation was evident. On the other hand, NLRP3 inflammasome activation was evident in the hippocampus in PN7, especially for the

SFA-HFD group. For PN28, NLRP3 inflammasome activation and microglial activation were evident in both the prefrontal cortex and hippocampus in both the SFA-HFD and O6/O3:20/1-HFD groups. The high Omega-3 level in the O6/O3:2/1-HFD group had a decreasing effect on inflammasome activation.

Conclusion :

Feeding dams with a high-fat diet during pregnancy and lactation causes microglial and NLRP3 inflammasome activation in the brain.

Keywords: Neuroinflammation, microglia, NLRP3, newborn, hippocampus, prefrontal cortex

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Santral Sinir Sistemi Embriyolojisi ve Anatomisi

Fonksiyonel ve işlevsel açıdan vücudun en karmaşık sistemlerinden biri olan santral sinir sisteminin en önemli ve araştırmaya açık bölümlerinden birisi hiç kuşkusuz beyindir. Kranium ile korunan ve periosta meningeal zarlar aracılığı ile bağlanarak korunan beyin ; medulla oblongata, pons ve mezensefalondan oluşan beyin sapı ve beyin sapının üst komşuluğunda yer alan sağ ve sol hemisferium serebri'den oluşur. Embriyolojik olarak santral sinir sisteminin oluşması nöral tüpün gelişmesi ile başlar. Embriyolojik olarak farklı beyin veziküllerinden gelişen farklı bölgelere sahip beyin yüzeyel anatomisi incelendiğinde sağ ve sol hemisferlerden oluştuğu görülür. İnsan beyni jirensel olarak tanımlanan kıvrımlı bir yüzeye sahiptir. Giruslar ve sulkuslar sayesinde neokorteks kıvrımlı bir yapı kazanır. Böylece kafatası içinde kısıtlı bir bölgeye sığabilmesi sağlanmış olur. Fonksiyonel ve hücresel yapılanması farklı olan ve sulkuslar sayesinde sınırları belirlenen dört loba ayrılmaktadır. Her hemisferde frontal , parietal , temporal ve oksipital loblardan oluşur. Hemisferlerin iç yüzünde her iki hemisferi birbirine bağlayan “corpus callosum” yapısı bulunur. Korpus callosum yapısı lateral ventriküllerin tavanını oluşturmaktadır[1].

Sinir sistemi ektodermden köken alarak gelişen nöral plağın embriyonik üçüncü haftada kendi eksenini boyunca içe çökerek oluşturduğu nöral oluğun kapanması ile oluşan nöral tüpün dördüncü hafta sonunda tamamen kapanmasıyla birlikte; nöral tüpü oluşturan yalancı çok katlı prizmatik epitel yapısındaki nöroepitelyal hücrelerin proliferasyonu ile gelişmektedir. Nöral tüpü oluşturan hücreler çoğalıp farklılaştıkça nöral tüp epiteli kalınlaşarak; ventriküler tabaka, ara tabaka ve marjinal tabaka adı verilen 3 katmanlı bir yapıyı oluşturur. Nöral tüpün daha geniş olan sefalik bölgesinden beyin vezikülleri gelişmeye devam ederken; kaudal bölgesi daha dar olup buradan santral sinir sisteminin diğer bir parçası olan omurilik gelişmektedir. Nöral tüpün farklı eksenlerde gelişimini belirleyen farklı genler olmakla birlikte ; beyin sefalokaudal eksen boyunca biçimlenmesini ve prosensefalon ya da önbeyin, mezensefalon ya da ortabeyin ve rombensefalon ya da arkabeyin olarak adlandırılan primer beyin veziküllerinin gelişimini de sağlayan en önemli genlerden biri Homeobox(HOX) genleridir. LIM1, OTX2 , OTX1, EMX1, EMX2 önbeyin-ortabeyin gelişimine ve ayırımına katkıda bulunurken; FGF8 ekspresyonu ortabeyin-arkabeyin birleşim yerinde eksprese olarak ; ENGRAILED1 ve 2 (EN1 ve EN2) genlerinin ekspresyonunu

tetikler ve böylece EN1 ortabeyin dorsali ile anterior arka beynin gelişimine EN2 ise serebellum gelişimine katkıda bulunur. WNT1 ekspresyonu da ortabeyin gelişimde etkilidir. Gelişen bu primer beyin veziküllerinden embriyonik 5. haftada sekonder beyin vezikülleri oluşmaktadır. Arka beyinden gelişen sekonder beyin vezikülleri metensefalon ve myelensefalon iken; bu veziküllerden de sırasıyla pons ,serebellum ve bulbus gelişir. Orta beyinden gelişen sekonder beyin vezikülü mezensefalon olup ; ön beyinden gelişen sekonder beyin vezikülleri ise telensefalon ve diensefalonudur. Telensefalon serebral korteksi ve hipokampüsü oluşturan bölgedir [1], [2].

1.2. Serebrum Histolojisi

Tüm merkezi sinir sisteminde olduğu gibi beyinde de temel hücre tipleri nöronlar ve glia hücreleridir. Piamatere yakın olan ve hemisferlerin yüzeyini örten ; ayrıca nöron gövdelerinin bulunduğu üst kısım gri cevher/substantia grisea olarak adlandırılırken ; aksonların ve glia hücrelerinin yoğunlukta olduğu ve miyelin kılıfın lipid yapısı nedeniyle fıkse olmuş taze beyin dokularında beyaz veya krem rengi bir görünümdeki gri cevherin daha derininde yer alan bölge ise beyaz cevher/substantia alba olarak adlandırılır. Substantia alba içinde yer alan nöron toplulukları ise nükleus olarak isimlendirilmektedir[1], [3].

1.2.1. Substantia Grisea

Substantia grisea, allokorteks ve neokorteks olarak adlandırılan; ayrıca filogenetik ve histolojik farkları da olan iki tipe ayrılır. İnsan serebral korteksinin büyük çoğunluğunu neokorteks oluşturur. Allokorteks, neokortekse göre oldukça küçük bir alan kaplar ve paleokorteks,arkikorteks, periallokorteks olarak adlandırılan 3 farklı alt tipe ayrılır. Allokorteks; neokorteks ya da diğer adıyla izokorteks , yapısına göre daha ilkel bir yapıya sahiptir. Neokorteks 6 tabakalı yapıya sahipken; allokorteks yapısı 3-5 tabaka şeklinde düzenlenir. Arkikorteks en ilkel korteks yapısı olup, hipokampus, entorhinal korteks ve periamigdeloid kortekste bulunmaktadır[1].

Neokorteks yapısına bakıldığında histolojik olarak hücrelerin sayı ve şekillerine göre 6 tabakadan oluştuğu gözlenir. Serebral korteks, granüler (yıldız) hücre ve piramidal hücre olmak

üzere iki baskın nöronal tip içerir. Piramidal hücreler, serebral kortikal nöronların üçte ikisini oluşturur ve kortikal yüzeye doğru uzanan belirgin apikal dendritleri vardır. Aksonları, ipsilateral veya kontralateral korteks içine veya subkortikal bölgelere uzanmaktadır. Granüler hücreler daha küçüktür ve neokorteksin birincil internöronları olarak kabul edilir. Daha az yaygın olan diğer nöronlar; gelişim aşamasında pial yüzeye paralel uzanan horizontal hücreler , en derin kortikal katmanlarda en sık görülen fusiform hücreler ve tüm kortikal katmanlarda daha az sayıda bulunan Martinotti hücreleridir. Piamaterden daha derine doğru sitoarkitektürel tabakalar aşağıdaki gibi sıralanmaktadır[1].(Resim 1)

a) Lamina Molekölare (Lamina I) : Diğer tabakalar ile karşılaştırıldığında daha soluk boyanan ve piamater altında yüzeye paralel uzanmış iğ şeklindeki horizontal hücrelerin yer aldığı tabakadır. Bu hücreler neokorteksin ilk farklılaşan hücreleridir. Sinir liflerinin düzenlenişi ve yoğunluğuna göre olan miyeloarkitektür adı ise ‘‘ lamina tanjensiyalis’’tir. III. ve V. tabakakalardaki nöronların dendritleri ile VI. tabakadaki Martinotti nöronlarının aksonları bu tabakaya gelerek paralel bir şekilde dallanır.

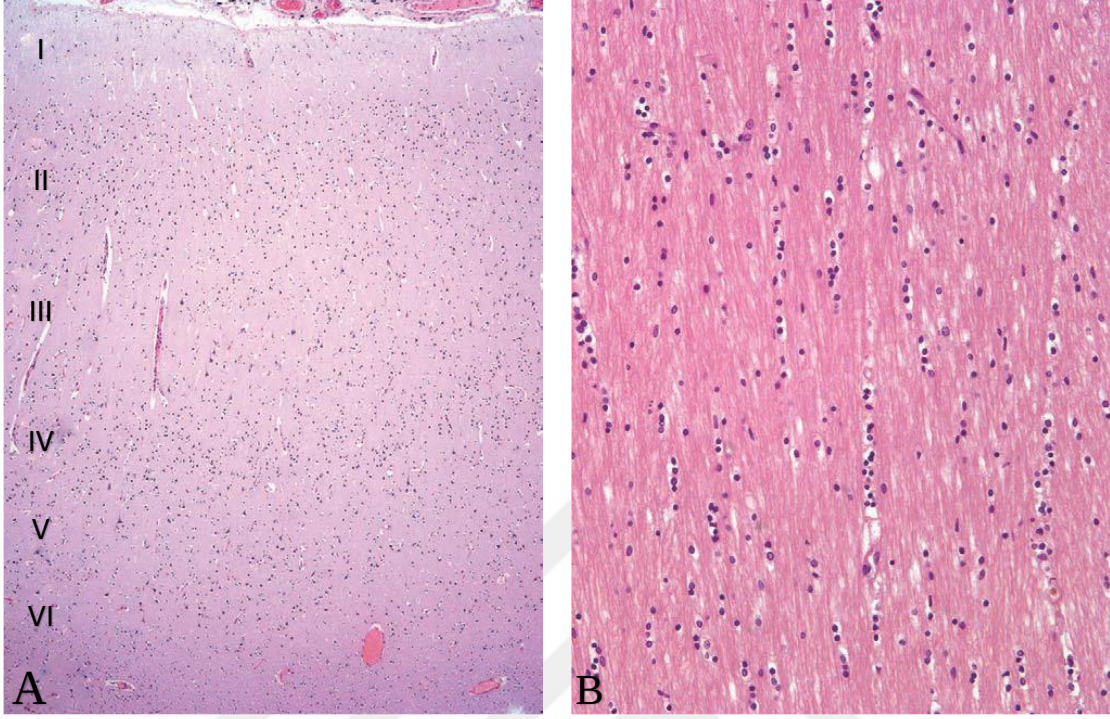
b) Lamina Granularis Eksterna (Lamina II) : Küçük piramidal nöronlar ve granüler nöronların bulunduğu ince bir tabakadır.

c) Lamina Piramidalis Eksterna (Lamina III): Küçük ve orta büyüklükteki piramidal nöronların bulunduğu tabakadır. Lamina II ve III ün piramidal nöronlarının aksonları aynı hemisferdeki nöronlarla assosiasyon bağlantıları kurarlar.

d) Lamina Granularis Interna (Lamina IV): Yıldız ve küçük granüler hücreler yer alır. Buradaki nöronların aksonları Lamina II ve III e uzanarak burada sinaps yapar. Buranın miyeloarkitektürel sınıflamaya göre adı ‘‘ Ballinger’ in dış bandı ‘‘ olarak geçmekte ve talamustan gelen afferent liflerce oluşturulmaktadır .

e) Lamina Piramidalis Interna (Lamina V): Ganglionik tabaka olarak da isimlendirilir.Orta ve büyük piramidal nöronlar bu tabakanın en önemli hücreleri olup; buranın miyeloarkitektürel sınıflamaya göre adı ‘‘ Ballinger’ in iç bandı ‘‘ dır. Primer motor kortekste yer alan Betz’in dev hücreleri ise; sinir sistemindeki en büyük piramidal hücre grubudur. Bu hücrelerin aksonları karşı hemisfere giden komissural yolları ve subkortikal beyin bölgelerine giden projeksiyonları oluşturur.

f) Lamina Multiforme (Lamina VI): Martinotti hücreleri adı verilen multipolar inhibitör nöronlar ile fuziform ve yıldızlı hücreler bu tabakada bulunmaktadır.



Resim 1: A. Neokorteksin sitoarkitektürel tabakaları B. Substantia Alba [3]

Bu tabakalar beynin farklı loblarında ve alanlarında farklı kalınlıkta olabilir. Örneğin; primer motor korteks alanında Lamina Piramidalis Eksterna oldukça belirgindir[1], [3].

1.2.2. Substantia Alba

Gri cevhere kıyasla daha geniş bir alan olan beyaz cevher farklı glial hücreler ile miyelinli ya da miyelinsiz sinir liflerinden oluşmaktadır. Buradaki sinir lifleri üç farklı şekilde seyrediyor olup; assosiasyon lifleri aynı hemisfer içinde farklı kortikal alanları birbirine bağlarken , komissural lifler karşı hemisfer farklı kortikal alanlar arasında olup, projeksiyon lifleri ise; serebral korteks ile serebellum ve beyin sapı arasındaki afferent ve efferent sinir lifleridir[1].(Resim1)

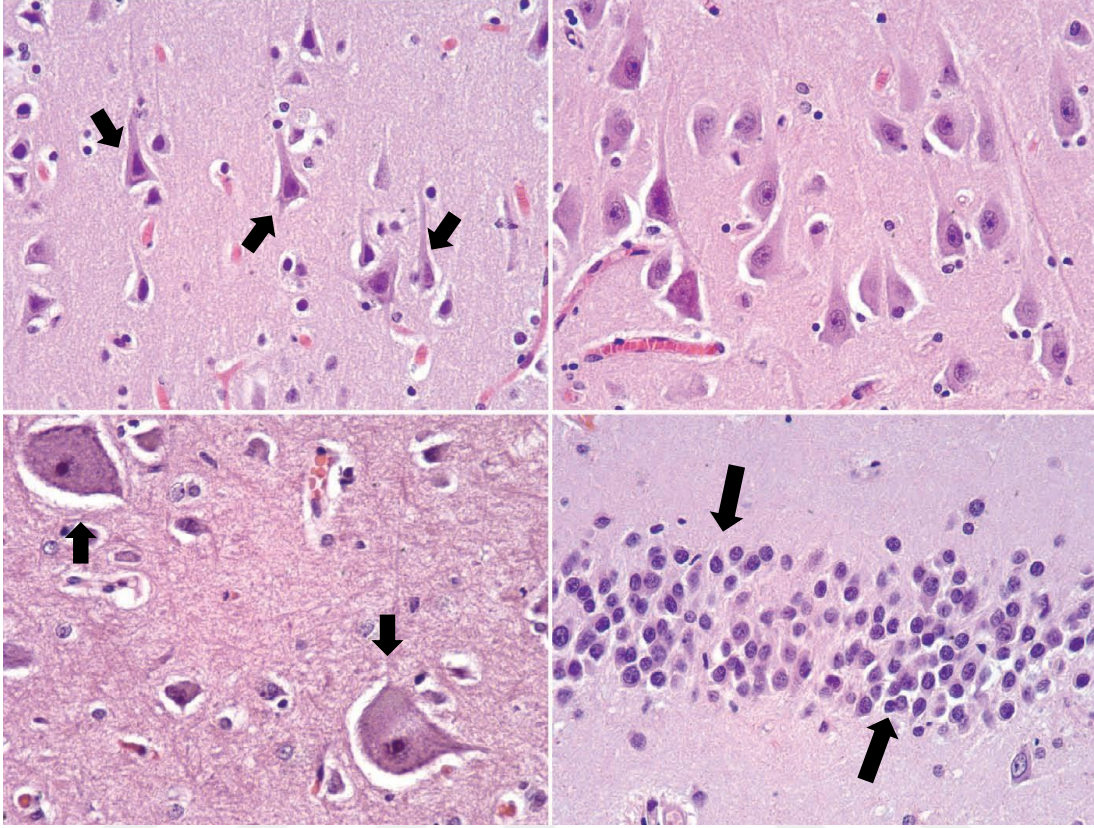
1.3. Serebral Korteks Hücreleri

Oldukça karmaşık yapısı ve hala çözülmeyi bekleyen işlevleri düşünüldüğünde beyin dokusunu oluşturan hücrelerin yapısının , görevlerinin ve patolojik durumlara karşı tepkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Esas olarak nöronlardan ve glial hücrelerden oluşan beyin parankimi aşağıda açıklanan hücrelerden oluşmaktadır.

1.3.1. Nöronlar

Santral sinir sisteminin gelen elektriksel ve kimyasal uyarılarını alan , algılayan ve ileten işlevsel hücreleridir. Perikaryon adı verilen gövdeleri ve diğer hücreler ile iletişimi sağlayan akson ve dendrit adında uzantıları bulunmaktadır[3]. Nöronlar multipolar, unipolar, bipolar, psödounipolar olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca işlevsel olarak projeksiyon nöronu, internöron gibi isimlendirilirlerken; kullandıkları nörotransmitterlere göre eksitatör ve inhibitör olarak da sınıflandırılırlar[1]. Farklı büyüklüklerde ve morfolojik tiplerde nöronlar bulunmaktadır.

- a) Piramidal Nöronlar; üçgen şeklinde büyük hücre gövdeleri olan serebral korteks ve hipokampusun prototipik hücreleridir. Belirgin nükleoluslu açık kromatinli oldukça büyük çekirdeği ve sitoplazmasında granüllü endoplazmik retikulumu temsil eden Nissl cisimcikleri belirgin olan hücrelerdir. 70-100 mikrometre çapı olan büyük piramidal hücreler üst motor nöronlar olup Betz'in dev nöronları olarak isimlendirilir. Bu hücrelerin boyutu ve sitoplazma miktarının fazla olması yanında Nissl cisimcikleri ve hücrenin uzantıları da normal piramidal hücrelere göre daha büyüktür.
- b) Granüler(Stellat) Nöronlar ; çapı 15 mikrondan daha küçük olan nöronlardır. Lamina I haricinde tüm laminalarda bulunur.
- c) Fusiform Nöronlar ; daha derin kortikal katmanlarda bulunur.
- d) Horizontal nöronlar : Cajal-Retzius hücreleri olarak da bilinen bu hücreler Lamina I de bulunurlar. Akson ve dendritleri aynı lamina içinde paralel bir şekilde yayılırlar. Nöronal göç ve kortikal laminasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesine yardımcı olan bu hücrelerin nörogelişimsel bozukluklarda rol oynayabileceği düşünülmektedir.
- e) Martinotti nöronları : küçük inhibitör nöronlardır. Somatostatin salgırlar. Piramidal nöronlarla sinaps yaparak bu hücrelerin aşırı uyarılmasına engel olur[1], [3].



Resim 2 :Santral sinir sisteminde yer alan çeşitli piramidal ve granüler nöronlar[3]

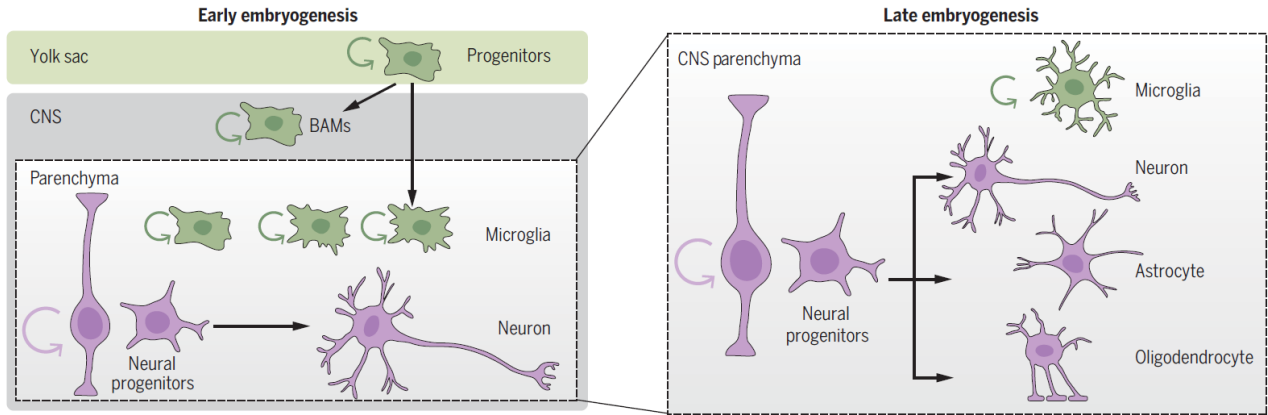
1.3.2. Mikroglia

Mikroglia hücreleri mononükleer fagositer sistem üyesi olup, santral sinir sisteminde(SSS) yer alan bağışıklık sistemine ait hücrelerdir[4], [5]. Yunanca ‘‘tutkal’’ anlamına gelen ‘‘glia’’ tanımı ilk kez 1856 yılında merkezi sinir sisteminde nöronal olmayan bölgelerin tanımlanması için Alman patolog Rudolf Virshow tarafından yapılmıştır[5]. Mikroglia’yı ayrı bir hücre olarak 1919’da ilk kez keşfeden ise İspanyol sinirbilimci Pio del Rio Hortega’dır[5]. Yetişkin bir beyin dokusundaki hücrelerin %90’ını glial hücreler (astrositler, oligodendrositler ve ependim hücreleri) oluştururken [3]; farklı bölgelerinde farklı yoğunlukta olmakla birlikte tüm hücrelerin %5-15’ini mikroglia hücreleri oluşturur [6]. Mikroglia hücreleri astrosit, oligodendrosit gibi diğer glial hücrelerin ve nöronların aksine nöroepitelyal progenitör hücrelerden köken almayan ; erken dönemdeki yolk kesesinden köken alan eritroid-myeloid progenitör hücrelerden gelişirler [7]. Sağlıklı yetişkin SSS’de microglial hücreler küçük gövdelidir ve çevreye yayılan dallanmış ince uzun prosesleri ile gözlenmektedir[4]. Ancak mikroglial hücrelerin tek tip hücre grubundan ziyade heterojen bir hücre topluluğu olduğu, beynin farklı bölgerinde farklı yoğunlukta ve hatta farklı

şekillerde olabildikleri son dönemde yapılan çalışmalarla desteklenmektedir[5], [8] . Yetişkin beyninden farklı olarak , gelişmekte olan beyinde ve erken postnatal dönemde mikrogliya morfolojisi uzantılarından yoksun ameboid şekildedir[5]. Ayrıca doğum sonrası ilk haftada mikrogliaların yetişkindeki mikrogliyal hücrelere göre daha proliferatif olduğu bilinmektedir[5]. Mikrogliyal hücreler antiinflamatuvar sitokinlerin salınması, hücrel artıkların fagositozu gibi yararlı görevler üstlenmekte ama ayrıca serbest oksijen radikallerinin üretimi ve inflamatuvar sitokinlerin salınımı gibi zararlı etkiler de ortaya koyabilmektedir[4]. Merkezi sinir sisteminde koruyucu bir role sahip olmakla birlikte , aynı zamanda homeostazisin sağlanmasında da oldukça önemlidir[9]. Tüm glial hücrelerden önce gelişmekte olan beyinde nöronlarla aynı zamanda çoğalan ve fonksiyon gösteren mikrogliya hücreleri bağışıklık fonksiyonlarının ötesinde ; bu gelişim sırasında nöronal yapılanmanın da en önemli düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır[5]. Gelişmekte olan fare beyninin analizi ile mikrogliyanın nöronal progenitör hücrelerin ve nöronların hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlarken ; aynı zamanda nöronal progenitör hücrelerin sayısının kontrolünü ve ölen ya da aşırı çoğalan nöronal progenitör hücrelerin fagositozu ile ortamdaki apoptotik hücrelerin temizlenmesini sağladığı da gösterilmiştir [5], [6]. Tüm bu süreçlerin nasıl düzenlendiği ise hala araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Mikroglialar ayrıca işlevsel olmayan sinaplasları ortadan kaldırmanın yanısıra sinaptik budanmada ve yeniden şekillenmede; ayrıca beyin gelişimi sırasındaki nöronal bağlantıların modülasyonunda da görev almaktadır[5], [6], [9]. Tüm bu görevlerde farklı sinyal yolları ve reseptörler görev almaktadır. Postnatal gelişim sırasında nöroprotektif IGF-1 üretimi ile V. tabakadaki kortikal nöronların sağkalımını desteklediği ayrıca IGF-1'in myelinizasyonda da önemli olduğu gösterilmiştir [10]. Mikrogliyal hücrelerin gen ekspresyon profillerine bakıldığında merkezi sinir sistemindeki bölgelere , cinsiyete ve canlının yaşına bağlı olarak oldukça özelleşmiş olduğu görülürken, bu transkriptomik farklılıklar fonksiyonel heterojeniteyi de göstermektedir[11]. Bu gen ekspresyon profillerine bakılarak farelerde PN(postnatal)14'te mikrogliyal olgunlaşmanın gerçekleştiği gösterilmiştir[12]. Örneğin farelerde PN3-5 günler arasında artan CD11(+) mikrogliyal hücre popülasyonu bu IGF-1 in kaynağı olup, PN7'den sonra bu alt popülasyonun azaldığı, ve PN28'de %3'ün altına düştüğü gösterilmiştir[10]. Neonatal mikrogliyanın Pax6, Vip , Sox11 ve NeuroD1 gibi nöroektodermal belirteçleri ifade ettiği gösterilmiş; ayrıca yenidoğan mikrogliasında Nestin ekspresyonu %30 olarak gösterilirken, yetişkin mikrogliasında bu oran %3.7 olarak bulunmuş[10].

SSS ile ilişkili bazı hastalıklar bozulmuş mikrogliyal fagositoz ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin; Mecn2 mutasyonu mikrogliyal fagositozu bozarak X 'e bağlı kalıtılan ve otistik belirtileri olan Rett Sendromunun patolojisine katkıda bulunmaktadır[5]. Mikrogliya hücrelerinin normal fizyolojik işlevleri arasında dopaminerjik ve korpus kallozum aksonları ile ilişkili olduğu ve bu aksonların ilerlemesini ve fasikülasyonunu sağladığı da gösterilmiştir [6]. Bununla birlikte farklı bağışıklık sistemi hücre gruplarının da ister mikrogliyal aracılığıyla ister doğrudan nöronları etkileyerek beyin gelişimini modüle edebildiği araştırılması gereken bir konu olarak bir kenarda durmaktadır[6].

Beyindeki nöroektoderm kökenli hücrelerin aksine mikrogliya hücreleri yolk kesesi kökenli myeloid hücrelerden kaynaklanır[4], [13], [14]. Dolayısıyla, normal damar gelişimi ve dolaşım sisteminin varlığı mikrogliya öncüllerinin beyne göçü ve lokalizasyonu açısından oldukça önemlidir[13]. Yolk kesesinden köken alan progenitör hücreler SSS parenkimasında mikrogliyal hücreleri oluştururken ; yine merkezi sinir sisteminde sınır ile ilişkili makrofajlar (border-associated macrophages (BAMs)) olarak tanımlanan meningeal, koroid pleksus ve perivasküler alanadaki makrofajlar da buradaki hücrelerden köken almaktadır[5], [6]. (Şekil 1)



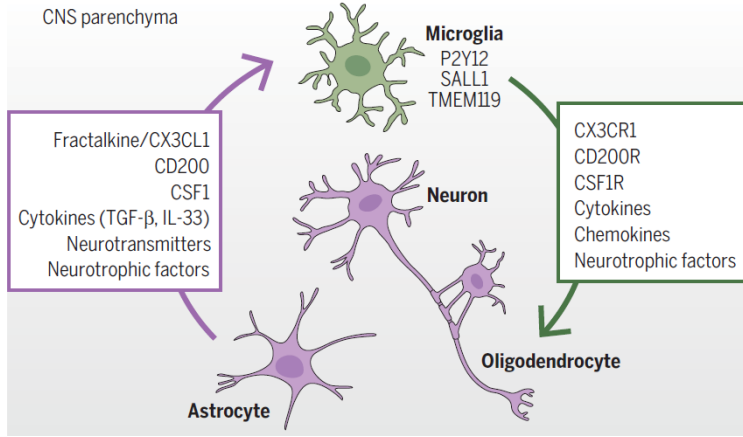
Şekil 1: Mikrogliya ve diğer SSS hücrelerinin embriyonik dönem gelişim şeması [6]

Farelerde yolk kesesinde E(embriyonik)7,5. günde eritromiyeloid prekürsörler ortaya çıkmaya başlar[4], [6], [11]. Bu hücrelerin bir alt kümesi mikrogliyal progenitör hücreleri oluşturarak E9,5 günde leptomeninksler ve lateral ventriküller aracılığıyla gelişmekte olan beyne kan beyin bariyeri gelişmeden önce (yaklaşık E13 . günde kan beyin bariyeri gelişir)[6] giren ameboid mikrogliyal hücreleri oluşturarak ; E10,5 ve P0 da hızla proliferasyon göstererek sayılarını arttırırken

; insanda 4,5. gestasyonel haftada piamater, koroid pleksus ve ventriküller aracılığıyla gelişen beyin veziküllerine göç eder[11], [13]. Fare beyinde kortekste mikrogliya kolonizasyonu sıralı dalgalar şeklinde gerçekleşir[6]. İlk atağı yavaş bir artış ile E10.5 ve E14.5 günlerde meydana gelirken ; ikinci atak hızlı bir proliferasyon ile E14.5 ve E15.5 günlerde meydana gelmektedir[4], [11]. E15.5 günde üçüncü bir atak ile mikrogliyal hücreler kortikal tabakadan ara ve ventriküler zona doğru yayılmakta bu da daha önce in vivo olarak progenitör hücre proliferasyonu ,nörogenez ve astrogenezi etkilediği gösterilen mikrogliyal hücrelerin ventriküler bölgede yer alan progenitör hücrelerin proliferasyonunda ve regülasyonunda görev aldığını düşündürmektedir [4]. Korteks mikrogliyal hücreler tarafından E16.5 günden doğum sonrası ikinci haftaya kadar kolonize edilir [7]. Doğumdan hemen sonra fare beyinde mikrogliyal proliferasyon 2 hafta boyunca artarken ; daha sonra 6. Haftaya kadar azalır, mikrogliyal apoptozun da eşlik etmesiyle toplam sayısının yarısına gelince sabitlenir[14]. Bazı sinyal yollarındaki değişiklikler nedeniyle azalan mikrogliyal hücre sayıları , beyin gelişimi sırasında gerekli olan sinaptik budanma ve sinaptik iletimin azalmasına ayrıca nöral progenitör hücrelerin etkilenmesi nedeniyle nöronal devrelerin bozulmasına yol açabilir[13].

Mikrogliyal hücrelerin nöronlarla olan bu etkileşimlerinin haricinde diğer glial hücrelerin ve damar sisteminin gelişimini desteklediği gösterilmiştir[5], [7]. Gelişmekte olan beyaz cevherdeki normal myelinizasyon ve oligodendrosit öncüllerinin gelişimi için buradaki mikrogliyaların önemli olduğu gösterilmiştir[5]–[7]. Astrositler de CSF1, IL-34, TGF- β ve kolesterol gibi trofik destek molekülleri sayesinde mikrogliyanın homeostatik morfolojilerini ve işlevlerini teşvik ederler[15]. Astrositler, mikrogliya ile birlikte sinaptik budanmada koordine bir şekilde hareket eder ve astrositler, dendritik apoptotik cisimleri yutarken mikrogliya ise dendritler,hücre gövdeleri ve nükleusları fagosit etmektedir[15]. Mikrogliya hücrelerinin embriyonik kolonizasyonunun cinsiyete göre değiştiği ; prefrontal korteks, hipokampus, amigdala ve preoptik alanda bu hücrelerin yoğunluğunun farklı olduğu gösterilmiştir[7]. Mikrogliyal yoğunluğa ek olarak ; mikrogliyal fonksiyon ve morfoloji cinsiyete göre de değişmektedir[11].

Mikrogliya hücrelerinin nöronlar ve diğer glial hücrelerin gelişimine ve fizyolojik işlevlerine olan katkısı yanında ; SSS de mikrogliyal hücrelerin bir takım mediyatörler aracılığıyla olgunlaşmasını ve yerleşimini etkilemektedir[6]. (Şekil2)



Şekil 2: Mikroglia ve diğer SSS hücreleri arasındaki etkileşim[6]

Mikroglia hücrelerinin SSS parankimine yerleşip sürekli çoğalarak kendini yenilediği düşünülmekte[7] ; dolayısıyla oluşan somatik mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar erişkin dönemde önemli patolojik süreçlere neden olabilmektedir ; örneğin farelerde yapılan bir deneyde ilkel hematopoez sırasındaki somatik mutasyonun nörodejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir[6].

Mikroglia hücreleri sürekli olarak SSS üzerindeki çeşitli reseptörler aracılığıyla tarayarak mikroçevrede meydana gelen değişiklikleri algılar ve çeşitli immün araçları salgılayarak nöroinflamasyonu düzenler[5]. Proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18, IL-23 ü sekrete edebilir[5]. Alzheimer hastalığında mikrogliyal inflamazom aktivasyonu nedeniyle kaspaz-1 aracılı IL1 β ve IL18 salınımı olduğu ; Multiple sklerozda ise kaspaz-1'in Gasdermin aktivasyonu yolu ile mikroglia ve oligodendrositlerde piroptozu tetiklediği gösterilmiştir[5]. Ayrıca mikrogliyalardan salınan IL-1 α , TNF- α ve C1q'nun nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalıklarda gözlenen nörotoksik bir astrosit formunu aktive ettiği bulunmuştur[5]. Aktive olmuş mikroglia hücresi salgıladığı sitokinler yanında ; mitokondriyal fonksiyonları bozan ve nörodejenerasyona neden olan reaktif oksijen radikallerinin de kaynağıdır[5].

Tüm bu merkezi sinir sistemi ile ilişkili hastalıkların patogenezinde yer alıyor olsa da ; mikroglia hücreleri primer mikrogliopatiler denilen bir grup hastalığın asıl nedeni olarak da ortaya çıkabilmektedirler[5]. Mikroglia fraktalkin reseptörü (Cx3cr1), iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü Iba-1 (*Aif1* tarafından kodlanır), CD11b ve koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü (Csf1r, CD115) gibi çok sayıda belirteç tarafından işaretlenebilir[5]. Tüm bu belirteçler merkezi

sinir sisteminde yer alan sınır ile ilişkili makrofajlar(BAM) olarak isimlendirilen makrofajlarca da eksprese edilebilmektedir ve yapılan scRNA-seq çalışmaları ile mikroglia ve BAM'lerin ayrımı yapılmış ve mikroglialar tarafından Tmem 119 , SLC2A5 , P2Y purinerjik reseptör (P2yr) 12 , beta-heksosaminidaz alt birimi beta (Hexb) gibi farklı transkriptomik belirteçler ortaya çıkarılmıştır[5].

Kronik strese yanıt olarak hipokampus, amigdala ve paryetal korteksteki mikroglial yoğunluğun cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bulunmuş, bu da mikroglial hücrelerin hem progesteron hem de östrojen reseptörü eksprese ettiği düşünüldüğünde seks hormonlarının mikroglia üzerindeki etkisini açıklar[13]. Dolayısıyla mikroglial yoğunluk, morfoloji ve işlev cinsiyetten etkilendiği unutulmamalı ; elde edilecek sonuçlar bu durum göze alınarak eleştirel olarak değerlendirilmelidir[13]. Mikroglia beyindeki sinaptik bağlantıların düzenlenmesini dendritik dikenlerin ve akson terminallerinin yutulması yoluyla düzenliyor gibi görünmektedir[13].

Farelerde mikroglialının prenatal dönemde aksonal büyüme ve internöron düzenlenmesinde görev aldığı görülürken; postnatal dönemde sinaptik budanma ve nöral devrelerin düzenlenmesinde görev almaktadır[10], [13]. Nöronal aktiviteyi ve sinaptik plastisiteyi düzenler[13]. Ayrıca yenidoğan mikroglialının transkriptomunun yetişkin mikroglialından farklı olduğu; yetişkindeki inflamasyonla aktive olan mikroglialının aksine myelojenik ve nörojenik bir fenotipin de varlığı gösterilmiş[10].

Mikroglialının fonksiyonları düşünüldüğünde , beyin gelişimi sırasında meydana gelen mikroglial hasar ve fonksiyon kaybı nöral bağlantıların kaybı ve hücresel debrisin temizlenmesini bozarak nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklara zemin hazırlayabilmektedir[13].

Mikroglialının diğer glial hücreler ve özellikle de nöron ile olan etkileşimleri esas olarak erken prenatal dönemdeki faktörlerden etkilenmekte ve yapılacak çalışmalar ile bu etkileşim mekanizmalarının nörogelişimsel bozukluklara olan etkisinin aydınlatılması gerekmektedir[6]. Çalışmalar genellikle prenatal dönem ve erken postnatal döneme odaklansa da beyin devrelerinin yeniden düzenlendiği ve bazı hastalıklar için kritik bir pencere olan ergenlik dönemi ve cinsiyet özelinde nöroimmün etkileşimlerin incelenmesi de oldukça önemli olan diğer noktadır[6].

Mikroglia hücrelerinin bölgesel heterojenliği ve farklı gen ekspresyonuna sahip olan çeşitli alt tiplerinin olduğu düşünüldüğünde ileride yapılacak çalışmalarda hangi alt tiplerin diyetle ilgili olarak hangi bölgelerde arttığı/ azaldığı aydınlatılması gereken noktalardan biridir[8].

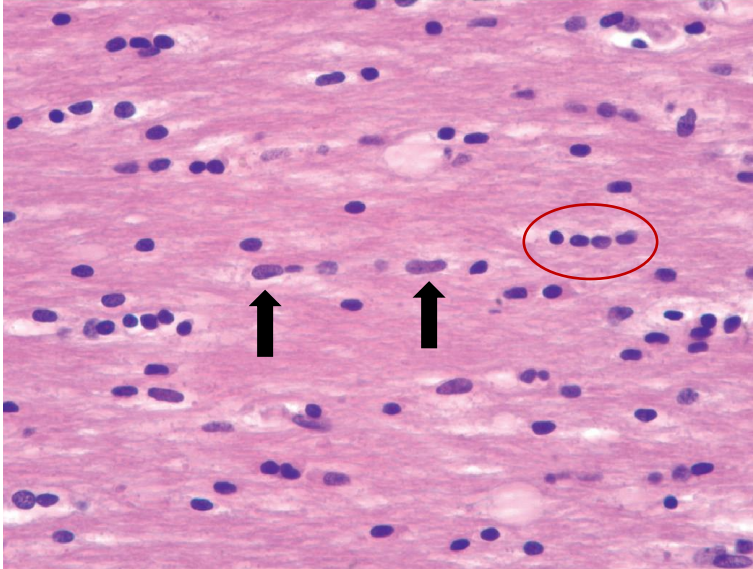
1.3.3. Astrositler

SSS'nin çok kutuplu hücreleri olan astrositlerin gövdelerinden çıkan çok sayıda uzantı etraftaki nöropile ulaşarak sinapsları çevreler[1]. Kortekste daha fazla bulunan protoplazmik astrositler ve beyaz cevherde daha fazla bulunan fibröz astrositler olarak ikiye ayrılır. Glial fibriler asidik protein(GFAP) olarak isimlendirilen sitoplazmik ara filamentler sitoplazmasında bol miktarda bulunur ve immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi bu protein ile sağlanabilir. Kan beyin bariyeri ile bos beyin bariyerinin oluşmasında görevli uç ayaklara sahip uzantıları bulunur[3].(Resim3)

Astrositler de mikrogial hücreler gibi sinapsların oluşumu, oligodendrosit progenitörlerinin göçü , gelişimi ve dolayısıyla SSS'nin doğru myelinizasyonu için gerekli hücrelerdir[16].

1.3.4. Oligodendrositler

SSS'nde myelinizasyonu sağlayan hücrelerdir. Dolayısıyla beyaz cevherde gri cevhere göre çok daha fazla bulunurlar. Etraflarındaki çoklu aksonal ağları myelinize ederler. Histolojik olarak düzgün sınırlı koyu bazofilik boyanan küçük nükleusları ve daha soluk boyanan perinükleer halo yapısı ile görünürler[3](Resim3). Myelinizasyon görevi dışında nöronlara BDNF,IGF-1 ve GDNF salgılayarak destek olurlar[1].



Resim 3 :Astrositler(siyah ok) ve Oligodendrositler (kırmızı daire içinde gösterilmiştir) [3]

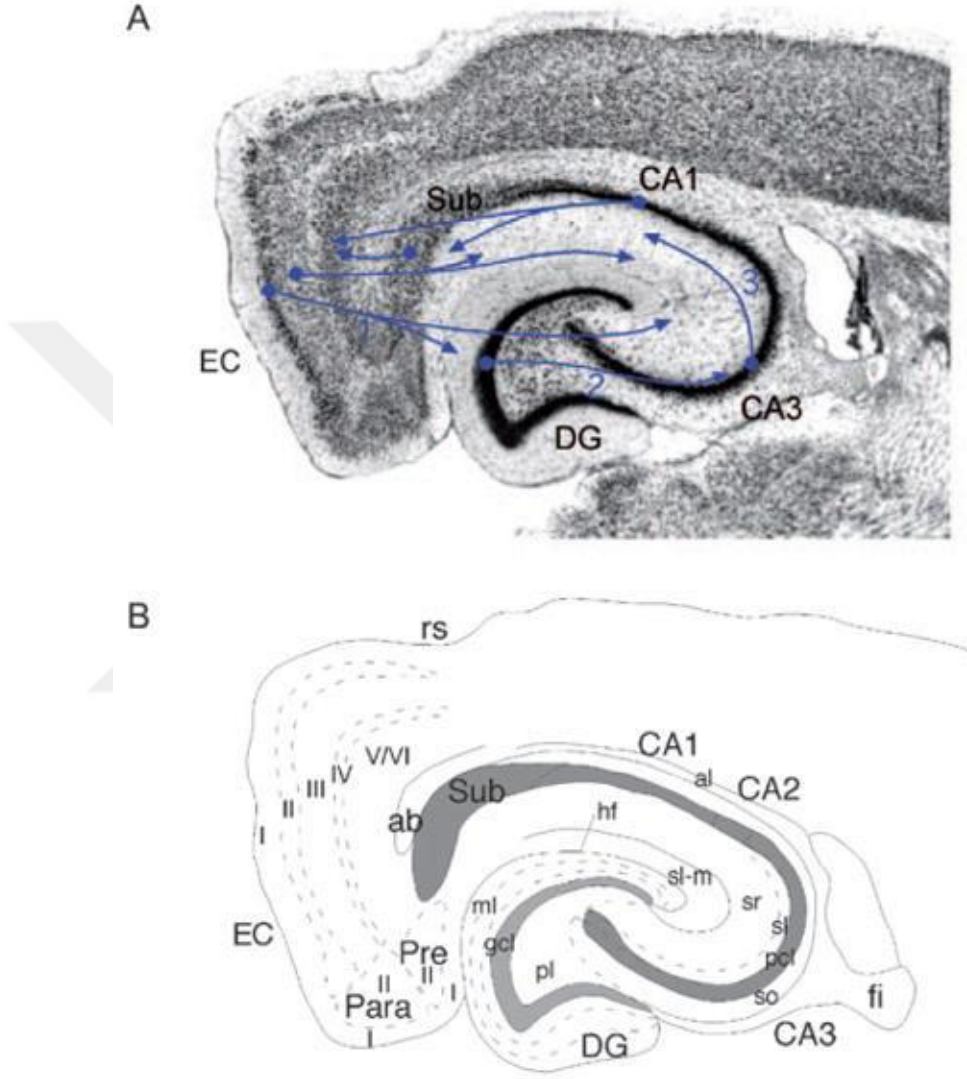
1.4. Hipokampüs

Hipokampüs limbik sistemin en önemli kısımlarından biri olmakla birlikte; bellek, öğrenme, öfkenin ve agresif davranışların kontrolü , yön bulma ve hatta hipotalamusla kurduğu bağlantılar nedeniyle endokrin fonksiyonlar üzerinde rol oynaması nedeniyle araştırmalarda en çok incelenen bölgelerden biridir[1], [17].

Hipokampüs ; cornu ammonis (hipokampus proprius), girus dentatus ve subikulum olmak üzere 3 ana kısımda incelenir . Subikulum, entorinal korteks ve hipokampüs arasındaki geçiş bölgesidir. Hipokampus proprius cornu ammonisin kısaltması olan CA kısaltması ile temsil edilen CA1 , CA2, CA3 ve CA4 bölgelerine ayrılır ve bu şekilde incelenir. CA1 subikuluma, CA4 ise girus dentatusa (GD) yakın olan bölgedir . Kornu Ammonis; alveus, stratum oriens, stratum pyramidale ,stratum lusidum, stratum radiatum ve stratum lakunosum olmak üzere 6 tabaka içerir. Stratum lusidum; en ince tabakasıdır ve sadece CA3 bölgesinde bulunur. CA3 alanındaki piramidal hücreler ile dentat girusun granüler hücreleri arasında bağlantı sağlayan yosunsu (mossy) lifleri içerir. Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgin olup CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz . Stratum pyramidale; çoğunlukla büyük piramidal ve Golgi tip II hücrelerinin bulunduğu tabakadır. Bu tabakadaki piramidal hücrelerin dizilimi hipokampüsün c şeklindeki kıvrımlı yapısını oluşturur. Stratum radiatum ve stratum lakunosum; piramidal hücrelerin dendritlerinin oluşturduğu bir tabaka olup; az sayıda nöron içeren bölgelerdir[1], [17], [18]. CA3 girus dentatusun hilusundan (yani CA4) çıkar. CA1 ile CA3 arasında görece daha ince dağınık ve küçük piramidal hücrelerin olduğu bölge CA2 olarak ayırt edilebilir. CA1 bölgesi toksik maddelere , hipoksiye ve dejeneratif hastalıklara daha duyarlı olan bölgedir[3].

Dentat girusun temel hücreleri granüler nöronlardır. Dentat girus 3 tabaka içerir .Stratum molekölare hücre içermeyen bir tabaka olup; entorhinal korteksten çıkan perforan afferent liflerden oluşur.Stratum granölare (granüler hücre tabakası); yoğun paketlenmiş granül hücrelerinden oluşur. Polimorfik hücre tabakasında; birçok nöron tipinin yanında yosunsu lifler ağırlıklı olarak gözlemlenir. Polimorfik piramidal hücreler ve çok sayıda internöron bulunan polimorfik tabakayla olan sınır bölgesinde dentat piramidal sepet hücreleri gibi farklı tip nöronlar da yer alır. Granüler

hücre tabakasının iç kısmı ile hilus arasındaki sınır bölgesine subgranüler zon (SGZ) adı verilir. Bu bölgede radial gliya benzeri nöral kök hücreler bulunur. [1], [19]. (Resim 4)



Resim 4 : Rat hipokampusu [19] (Sub: Subiculum, EC:Entorinal Korteks ,DG:Dentat Girus)

1.5. Prefrontal korteks

Prefrontal korteksi topografik olarak ilk kez Brodmann tanımlamış, ve primatlarda granüler korteks olarak tanımlanmasına neden olan frontal bölgedeki lamina IV ün daha belirgin

olduğunu bulmuştur. Diğer türlerle karşılaştırmalı çalışmaları yaparken primat olmayan canlılarda bu bölgenin ya hiç olmadığını ya da belirgin olmadığını keşfetmiştir. Rose ve Woolsey ise talamusun mediodorsal nükleusundan projeksiyon lifleri alan bölgeyi frontal korteks olarak tanımlamış ; primatlarda ve primat olmayan memelilerde granüler korteks olarak tanımlanan bölgeyi de içeren sınırlı bir frontal alanın buradan projeksiyon aldığını göstererek memelilerde de primatların granüler frontal korteksine eşdeğer bir bölgenin olduğu sonucuna varabilmeyi sağlamışlardır. Farelerde mediodorsal çekirdek haricinde diğer talamik çekirdeklerin de burayı hedef aldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu projeksiyonel homoloji işlevsel benzerlik için kesin kanıtlar sunamaz. Farklı araştırmacılar farklı alanları ve isimlendirmeleri kullanmakta ve fareler için kesin bir uzlaşmış bölge ve isimlendirme bulunmamaktadır[20]. Kemirgenlerde medial prefrontal korteks olarak geçen alan anterior cingulat korteks, infra limbik korteks, prelimbik korteksi tanımlanmaktadır[21]. Toplam kortikal alanın %30'unu oluşturan prefrontal korteks insan evrimi sırasında kortikal alanın geri kalanına göre daha fazla büyümüştür[20]. Fonksiyonel olarak hem insanlarda hem de hayvanlarda bilişsellik ile ilgilidir. Dikkat , karar verme , motivasyon ,yürütücü işlevler bu bölge ile sağlanır[20], [21]. Bu bölgenin işlev bozukluğu şizofreni ,dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ,depresyon gibi hastalıklarla ilişkilendirilir[21].

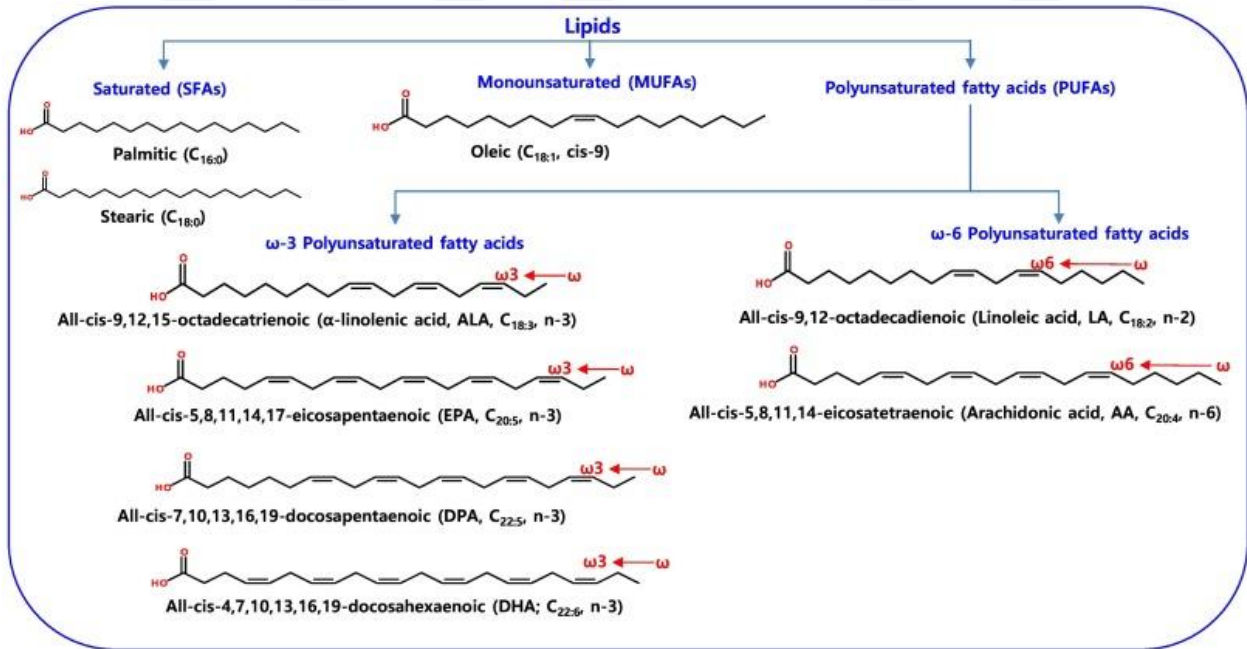
1.6. Yüksek yağlı diyet ve Obezite

Diyet alışkanlıklarının değişmesine ve diyetle alınan yağ miktarındaki artışa paralel olarak dünya çapında obezite prevalansı ve buna bağlı olarak da obeziteye bağlı komplikasyonlar artmaktadır [22], [23]. Dünya Sağlık Örgütü , obeziteyi sağlığa zararlı olabilecek anormal ve aşırı yağ birikimi olarak tanımlar. Obezite neden olduğu kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, solunum yolu hastalıkları, kanserler, kas-iskelet sistemi hastalıkları nedeniyle dünyadaki en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir[24]. Ayrıca, obezite nörodejeneratif hastalıklar [25], [26] ve nörogelişimsel hastalıklar[27] açısından da önemli bir risk faktörüdür. Yüksek yağlı beslenme, obezitenin temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Uzun süreli yüksek yağlı diyet proinflatuar sitokinlerin artışına neden olur [23] . Aşırı yağ tüketimi ve buna bağlı artan adipozite nedeniyle artmış inflamatuvar sitokin üretimi gözlenmekte ve obezite, kronik bir inflamasyon durumu olarak kabul edilmektedir [22], [27]–[30] . Obeziteyi inflamatuvar bir hastalık

olarak düşündüğümüzde, inflamasyona odaklanarak bu konudaki tedavi stratejileri için araştırma yapma gerekliliği öne çıkmaktadır [24]. Diyetteki yüksek yağın yağ asidi içeriği de diyetin oluşturacağı inflamatuvar etkiyi değiştirmektedir [29], [30]. Doymuş yağ asitleri yağ dokusu ve makrofajlarda toll like reseptör (TLR) 4 ve 2'nin aktivasyonuna neden olarak nükleer faktör kappa B (NF- κ B) nin artmasına bunun sonucunda da proinflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve TNF- α 'nın ekspresyonunda artışa neden olur [22], [28]. Yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu inflamasyonun etkileri sadece periferik dokularda gözlenmemekte; SSS'nde de değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bazı çalışmalarda obezitenin ve aşırı yağ tüketiminin beyin yapılarında özellikle hipokampüs, prefrontal korteks, striatum, hipotalamusta anormalliklere neden olabileceği gösterilmiş; bu alanlarda inflamatuvar parametreler artmıştır [24]. Yüksek yağlı beslenme inflamatuvar yanıtları arttırarak, nöroinflamasyona neden olur; bu da bilişsel kapasiteyi olumsuz etkiler [22], [29]. Anormal sitokin üretilmesi, inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek nörofizyolojik mekanizmaları bozar bu da Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar açısından yüksek risk oluşturur [26]. Yüksek yağlı diyetle beslenen hayvan modellerinde hipokampüste nöral progenitor hücre proliferasyonunda ve sinaptik plastisitede azalma olduğu gösterilmiştir [26]. Başka bir çalışmada yüksek sature yağ asitlerinden zengin diyetle beslenen C57BL/6 farelerde yüksek yağ tüketiminin oligodendropatiyi ve oligodendrosit farklılaşmasında bozulmaları tetiklediği gösterilmiş; tek başına yüksek yağ tüketiminin farelerin beyin ve omuriliklerinde demiyelinizan etkileri tetiklemekte yeterli olduğu bulunmuştur [25]. Yüksek yağlı diyet ile beslenme modellerinde diyetten gelen enerjinin ne kadarının yağ olduğu önemli olduğu kadar; yağın yağ asit profili de oldukça önemlidir. Sature yağ asitlerinden (SFA) yüksek yağların daha obezogenik olduğu, poliansature yağ asitleri (PUFA) ve monoansature yağ asitleri (MUFA) içeriği daha yüksek diyetlerin daha az obezogenik olduğu gösterilmiştir. Yağ asitlerinin doygunluğu iştahı baskılamada önemlidir. Linoleik asit içeren yağlar, oleik ve steraik yağ asitleri açısından zengin yağlara göre daha doyurucudur. PUFA, kolesistokinin artışı yoluyla MUFA ve SFA ya göre daha güçlü bir şekilde iştahı baskılar. Poliansature yağ asitlerinin terminal çift bağının konumu da obezitenin gelişimini değiştirebilir. Dolayısıyla diyetteki yağın omega6:omega3 oranı da oldukça önemli bir faktördür[30].

1.7. Omega 3 ve Omega 6 Yağ Asitleri

Omega 6 ve omega 3 çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) esansiyel yağ asitleridir. İkisi arasındaki fark yağ asidi molekülünün metil ucundan başlayarak sayılan ilk çift bağın konumudur. Omega-6 yağ asitlerinden olan linoleik asit (LA) (18: 2 ω -6) şeklinde ve omega-3 yağ asitlerinden alfa-linolenik asit (ALA) (18: 3 ω -3) şeklinde gösterilir. Her iki yağ asidi de daha uzun yağ asitlerine metabolize edilir. LA, araşidonik aside metabolize edilirken; ALA, eikosapentaenoik aside (EPA) (20: 5 ω 3) ve dokosaheksaenoik aside (DHA) (22: 6 ω 3) metabolize edilir[31]. Desaturasyon enzimleri arasında omega6 ve omega3 için bir yarış vardır ve omega 6 yağ asitlerinden fazlasıyla zengin batı diyetlerinde (omega6: omega 3 oranı; 15-20:1) olduğu gibi yüksek LA alımı, ALA'nın desaturasyonuna engel olur. Bu da metabolik olarak zıt fizyolojik etkilere sahip olan bu iki yağ asidinin diyetle alınan miktarının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir [31], [32]. Omega 6 sistemik proinflatuar yanıtı neden olurken; omega 3 antiinflatuar durumları destekler [31], [32]. (Şekil 3)



Şekil 3 : Doymuş yağ asitleri(SFA) ile Tekli doymamış(MUFA) ve Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) [33]

Omega 3 ve omega 6 çoklu doymamış yağ asitleri hücre zarlarının ana bileşenleridir [32]. Genetik olarak belirlenen hücre protein bileşiminin aksine, hücre zarının çoklu doymamış yağ asidi kalitesi ve oranı diyetten önemli ölçüde etkilenir [34]. Memelilerde serebral korteks, retina, testis ve sperm özellikle DHA açısından zengindir. DHA, beynin yapısal lipidlerinin en bol bulunan bileşenlerinden biridir [31]. Membran PUFAlarının miktarı ve bileşimi sinir sisteminin gelişimi ve olgunlaşması için sinyal görevi görebilir [34]. Beynin kuru ağırlığının %15-30 unu omega 3 ve omega 6 çoklu doymamış yağ asitleri oluşturmakta ve özellikle DHA gri cevherin yapısal lipidlerinin ana kaynağını oluşturmaktadır[24], [32]. Gebelikte özellikle son trimesterde ve yaşamın erken evresinde özellikle ilk 2 yılda yeterli omega 3 alınması merkezi sinir sisteminin işlevselliği ve mimarisi açısından oldukça önemlidir [32], [34]. Aksine perinatal aşırı omega 6 maruziyetinin yavrularda aşırı yağlanma ve obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [31]. İnsan çalışmalarıyla son trimesterde ve postnatal ilk 18 ay içinde DHA nın hızla beyinde biriktiği bulunmuştur. Bu dönemdeki omega 3 ve omega 6 poliansatüre yağ asitlerinin ana kaynağı; bu maddeleri plasenta ve emzirme yoluyla yavruya aktaran annedir [32].

1.8. Maternal beslenme ve yavruya etkisi

Gebelikte ve laktasyon döneminde annenin beslenmesi, çocuğun fetal ve postnatal gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden biri olmakla birlikte; aynı zamanda da tüm yaşamını etkileyen ve metabolik hastalıklara da duyarlılığını değiştiren bir faktör olarak görülmektedir [35], [36]. İnsanlarda annenin yüksek yağlı beslenmesi nedeniyle çocuğu etkileyen plasental yetmezlik, fetal büyümede kısıtlılık, hepatosteatoz, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, nörogelişimsel bozukluklar gibi bazı durumlarda risk artışı görülebilmektedir[27], [35]. Hayvan çalışmaları maternal obezitenin yavrularda bu gibi hasarlara yol açan mekanizmaları anlamak adına oldukça önemli olmuştur [27]. Araştırılan pek çok mekanizma olmakla birlikte en önemlilerinden birisi inflamasyondur. İnflamatuvar faktörler, kan plasenta bariyerini geçerek fetal beyin gelişimini etkilemektedir [27]. Hem kemirgenlerde hem de primatlarda yapılan deneyler uzun süreli yüksek yağlı anne beslenmesinin yavrularda inflamatuvar belirteçlerin yükselmesine neden olduğunu göstermiştir [27]. Kemirgenlerde hamilelik sırasında yüksek yağ tüketimi yavruların hipokampüsünde proinflamatuvar sitokinlerin artmasına ve mikrogliya aktivasyonuna neden olmuştur. Farelerde yapılan deneyde maternal yüksek yağlı diyetle maruz kalan yavruların

hipokampüsünde NOTCH sinyal yolu aracılığıyla nörogenezin engellendiği ve hipotalamik hücre proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir [36]. Yine çalışmalarda maternal yüksek yağlı diyetin kan beyin bariyerini bozduğu gösterilmiştir. Öte yandan gebelikte DHA desteğinin bebeğin nörogelişimini desteklemek adına oldukça önemli olduğu bilinmektedir [34]. Omega 3'ün, yüksek yağlı diyetin beyin üzerindeki olumsuz etkilerini tersine çevirerek beyindeki inflamatuvar belirteçleri azalttığı gösterilmiştir [24]. Yapılan diğer bir çalışmada maternal yüksek yağlı diyetin yavruların cinsiyetine göre de farklı etkiler gösterebileceği araştırılmış; erkek yavrularda hipotalamik CB1 aktivasyonu artarken, dişi yavrularda CB2 yi arttırdığı gösterilmiştir [37].

Mikroglia ve SSS'nin diğer hücrelerinin gelişiminde ; bu hücreler arasındaki karşılıklı etkileşimlerin ve lokal etkilerin haricinde anneden gelen sinyaller de tabi ki oldukça önemlidir[6]. Annedeki sistemik inflamasyonun hasarlı beyin bağlantıları ile ilgili olduğu iyi bilinmekte ayrıca yapılan çalışmalarla da bunlar desteklenmektedir[6]. Mikroglia gelişiminin cinsiyetten ve mikrobiyota ile prenatal ve postnatal inflamasyonun neden olduğu sinyallerden etkilenmekte olduğu bilinmektedir[6]. Hatta bu inflamatuvar yanıtlar cinsiyete göre de değişmektedir[6] . Maternal immün aktivasyonun zararlı etkilerinin ve bu nedenle gelişebilecek nörogelişimsel bozuklukların cinsiyete bağlı etkisinde mikrogliaların aracılığı oldukça önemli noktalardan biridir[7].

Herhangi bir etkene maruz bırakılmamış normal bir beyinde frontal korteks , singulat korteks ve hipokampus IL1-beta seviyeleri postnatal 0,7,14,30,60. günlerde incelenmiş; singulat korteks ve hipokampüste yaşla birlikte beyindeki IL1-beta seviyeleri benzer değerlerde bulunurken; frontal kortekste IL1-beta seviyeleri P0 ve P7'de önemli oranda yüksekken; P14'te anlamlı olarak düştüğü bulunmuş [38].

Annede gebelikte görülen enfeksiyon , maternal immün aktivasyon yoluyla ve bu aktivasyona aracılık eden sitokinler nedeniyle doğum sonrası beyinde oluşan patolojiler ve davranış sorunları, hatta şizofreni ve otizm spektrum bozukluğu gibi nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir[6], [7], [38]. Bu maternal immün aktivasyonun (MIA) hayvan modelleri, sırasıyla viral veya bakteriyel enfeksiyonları taklit etmek için poliI:C (bazı virüslerde bulunan çift sarmallı RNA'nın sentetik bir analogu) veya lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonları ile indüklenebilir[6]. Literatürde MIA için farklı dozlar farklı sıklıklarda kullanılmış, farklı bölgelerden enjeksiyon yapılmıştır[6]. Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) ile maternal immün stimülasyon sağlanan C57BL/6 farelerde PN0 da prefrontal korteks incelendiğinde

kontrole kıyasla IL1-beta, IL12 ve GM-CSF seviyelerinde anlamlı bir artış bulunurken ; P7, P14 ve P30 da bakıldığında ise IL1-beta seviyelerinin kontrole kıyasla daha düşük olduğu bulunmuş; hipokampusta ise doğumda IL1 beta seviyesi kontrole kıyasla daha düşüken, diğer günlerde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık görülmemiş[38]. Aynı çalışma , sinaptogenezin ve plastisitenin en yoğun olduğu dönemlerde (P7-P30) birçok beyin sitokininde kontrollere göre beklenmedik ve yaygın bir düşüş olduğunu ortaya koymuş; beklenen pro-inflamatuar fenotipin aksine dramatik olarak azalan sitokin sinyalleri, yavrularda değişmiş beyin bağlantısına ve otizm spektrum bozukluğu ve şizofreni benzeri davranışlara neden olan kritik bir değişken olabileceğini düşündürmüştür.

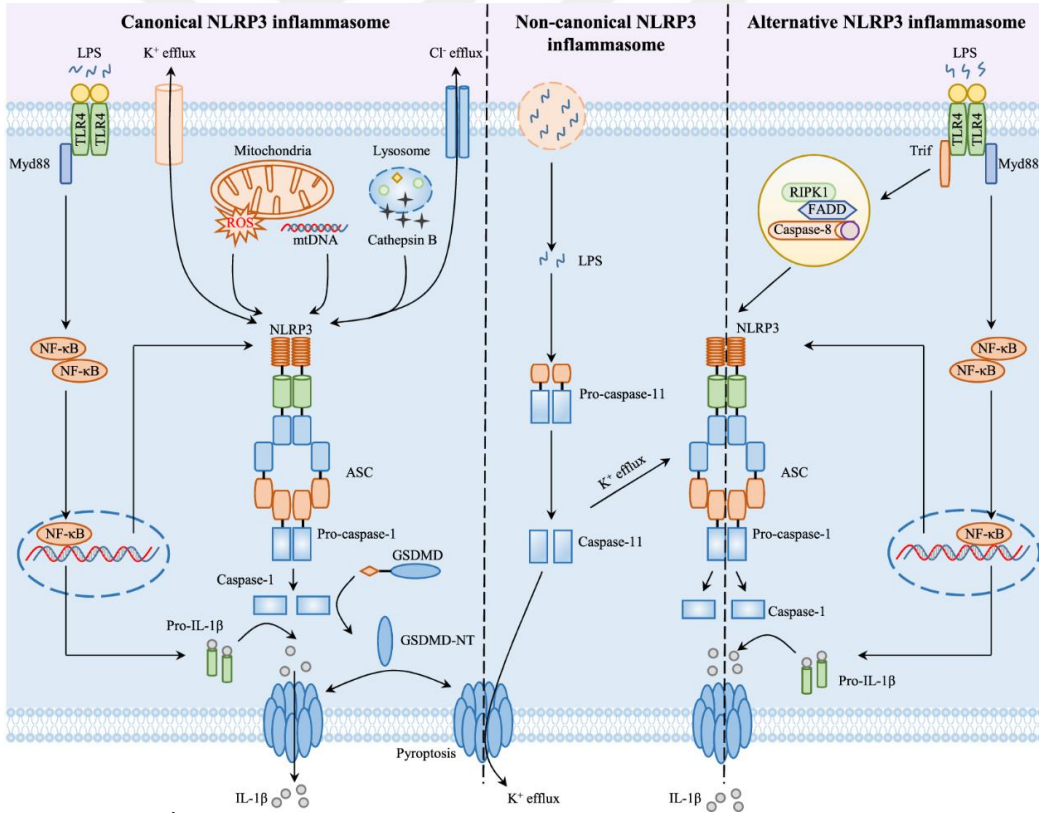
1.9. NLRP3 İnflamazom Yolağı

Nöroinflamasyon pek çok hastalık patogeneğinde yer almaktadır [26]. İnflamazom aktivasyonu da inflammatuar yanıtların başlamasına aracılık eden mekanizmalardan birisidir. Özellikle NLRP3 inflamazomunun çeşitli nörolojik bozuklukların etiyolojisinde kritik rol oynadığı bilinmektedir [26]. Ayrıca obeziteye bağlı inflamasyon ve insülin direncinin en önemli faktörlerinden biri de NLRP3 inflamazom yolağıdır [23], [39] . Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde karaciğer ve iskelet kasında inflammatuar belirteçlerin ve NLRP3 inflamasyonunun arttığı gösterilmiştir [23].

NLR (inflammasome forming nucleotide binding oligomerization domain (nod)-like receptors)'ler mikroglianin bazı istisnalar dışında endojen ve eksojen zararlı sinyalleri tanımasını sağlayan patern tanıma reseptörlerinden (PRR) biridir[40]. Diğer önemli PRR'ler, TLR (toll-like receptors) , TREM(triggering receptor expressed on myeloid cells) reseptörleridir[40]. NLR'ler üç ana bölgeden oluşur [41]. NLR'ler N ucundaki bölgenin çeşitlerine göre (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP ve NLRX olmak üzere beş ana grupta toplanır [42]. Her bir grupta yer alan alt tipler farklı sinyalleri tanımak üzere özelleşmiştir. Örneğin, NLRP1 anthrax lethal toksini; NLRC4 bakteriyel fragellini; ve NLRP3 eksojen ve endojen zararlı ve patojenik molekülleri örneğin; DAMPs ve patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) tanıyarak inflamazom komplekslerini oluştururlar [43], [44].

NLR'ler uyarıldıktan sonra inflamazom komplekslerini oluştururlar ve pro-inflamatuar IL-1 β ve IL-18 sitokinlerin salınmasında önemli rol oynarlar. Bu sitokinlerin pro- formlarının ekspresyonu bir diğer reseptör çeşidi olan TLR'ler tarafından genellikle nükleer faktör- κ B (NF-

κB) sinyal yolu aktif hale getirilerek gerçekleştirilmektedir[42].NLRP3 inflamazom kompleksi granülositlerin, monositlerin, makrofajların, dendritik hücrelerin, T ve B hücrelerin, nöron, astrosit ve mikrogial hücrelerin sitozollerinde oluşabilmektedir[45].NLRP3 inflamazom yolağının aktivasyonuna dair üç farklı yol tanımlanmıştır. NLRP3 inflamazomun proteolitik aktivite gösteren multiprotein yapısı sayesinde inaktif kaspaz-1 enzimi kesilir ve aktif hale geçen kaspaz-1 enzimi de pro- IL-1β (35kDa) sitokini keserek hücre dışına salınacak hale getirir [41]. Kaspaz-1 aktivasyonu ayrıca gasdermin-D'yi ayırır ve plazma zarı gözenek oluşumunun hücre lizisine neden olduğu bir hücre ölüm modu olan pirotozu tetikler[40]. Bunun dışındaki pek çok hücre ölüm yolağı da NLRP3 inflamazom yolağı ile ilişkilidir[46].Kanonik yol olarak tanımlanan bu aktivasyonun dışında iki farklı NLRP3 inflamazom aktivasyon yolağı bulunur: kanonik olmayan NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve alternatif NLRP3 inflamazom aktivasyonu[46] (Şekil 4).



Şekil 4 :NLRP3 İnflamazomu Aktivasyon Yolakları [46]

Olgun IL-1β (17 kDa) multifonksiyonel ve pirojen özelliğinde bir sitokindir ve hücre dışına salınan IL-1β sitokini immün hücrelerdeki IL-1 reseptörlerine bağlanarak lokal etkilere (örneğin;

lökosit infiltrasyonu ve lenfosit aktivasyonu) yol açabileceği gibi ateş yükselmesi ve akut faz protein indüklenmesine de sebep olabilmektedir [42], [45]. Ayrıca IL-1 β tamir mekanizmalarını da harekete geçirerek anjiyogenezi ve hücre kalıntılarının temizlenmesi için nötrofilleri de indüklemektedir [47]. IL-1 reseptör aktivasyonu sonucunda mitojen aktif protein (MAP) kinaz (MAPK) ve NF- κ B sinyal yollarının aktive olması ile daha da artan inflamatuvar sitokin ve kemokin salınımı ve adezyon moleküllerin ekspresyonu ile kazanılmış bağışıklık sisteminin devreye girmesine neden olabilmektedir [42]. IL-1 β sitokininin T hücre proliferasyonuna neden olduğu bilinmektedir [45]. Örneğin; bir çalışmada IL-1 β 'nın IL-17 salınımını uyardığı ve CD8 $^{+}$ $\alpha\beta$ T hücrelerini interferon-gamma (INF- γ) salınımı için indüklediği gösterilmiştir [48]. İnflamazom aktivasyonu enfekte veya hasarlı hücrenin ölümünü indükleyerek immun aktivasyondan başka bir biyolojik fonksiyon gösterir. İnflamazom oluşturan hücreler arasında, en güçlü inflammasom aktivasyonuna sahip olan mikrogliya / makrofajdır ve bu nedenle en yaygın olarak çalışılmaktadır [49].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada maternal yüksek yağlı diyetle beslenen annelerden doğan yavrular doğum sonrası yüksek yağlı diyetle beslenmeye 16. haftaya kadar devam ettirilmiş ve bu yavrularda epididimal yağ dokuda inflamazom aktivasyonuna bağlı olarak insülin rezistansının arttığı gösterilmiş [39].

1.10.Nöroinflamasyon

LPS enjeksiyonu sistemik inflamasyonu tetiklemek için deney modellerinde sıklıkla kullanılmakta olup, nöroinflamasyona da neden olmaktadır[16]. LPS ile oluşturulan sepsisin bir sonucu olarak deney hayvanlarında kilo kaybı görülmektedir[16]. Farelerde yapılan bir çalışmada özellikle IL6 ve IL17 'nin prenatal inflamasyon sonrası bozulan beyin bağlantıları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[50], [51]. Nöroinflamasyonun, nörolojik ve bazı psikiyatrik hastalıkların patogenezi ve beynin doğal yaşlanma sürecinin de bir parçası olduğu ile ilgili bilgiler gün geçtikçe artmakta ve özellikle bu inflamatuvar duruma glial hücrelerin katkısı bilinmektedir[52]. Dolayısıyla bu sürecin nasıl tetiklenebildiği ve hangi yollar üzerinden, hangi hücrelerin bu sürece etki ettiği araştırmalar için önem arz etmektedir.

2.GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel ve in vivo niteliktedir.

2.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Proje içeriği ile ilgili detaylı literatür taraması yapıldıktan sonra 14 Temmuz 2021 tarihinde etik kurul onayı alınmış olup ; sonrasında yürütücü değişikliği olması nedeniyle Ocak 2022 de etik kurul onayı güncellendi. Deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Projede yer alan laboratuvar basamağı için gerekli olan histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. (Tablo 1)

Tablo 1: Araştırma planı

Nisan-Haziran 2021	Proje içeriğinin belirlenmesi
	Literatür taraması
Temmuz 2021	Etik kurul onayı
Kasım 2021 -Ağustos 2022	Deneklerin temin edilmesi
	Enjeksiyon, besleme ve smear yapılması
	Sakrifikasyon ve dokuların toplanması
Mart-Ağustos 2022	Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların yapılması
Eylül-Ekim 2022	Elde edilen değerlerin istatistiksel olarak analizi
	Tez yazımı

2.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Bu çalışma 5 deney grubundan oluşmaktadır. 2 gruptaki dişi fareler standart kontrol yemi ile; diğer 3 gruptaki dişi fareler ise diyetten gelen enerjinin %50 sinin yağdan geldiği yüksek yağlı diyet ile beslenmiştir. Standard diyet (SD) literatürde belirtildiği şekilde yem firması tarafından üretilmiş olup 3.1 Kcal /gr enerji sağlayan %5 yağ, % 76.1 karbonhidrat ve % 18.9 protein içerecek şekilde oluşturulmuştur. Yüksek yağlı diyet(YYD) grubundaki tüm yemler yem firması tarafından üretilmiş olup 4.7 Kcal/gr enerji sağlayan %50 yağ, %20 protein ve %30 karbonhidrat içerecek şekilde oluşturulmuştur. Her grup için C57BL/6 türü 4 adet gebe fareden doğan 28 yavru fare; toplamda tüm gruplar için 140 adet yavru C57BL/6 türü fare deneyler sonucunda elde edilmiştir. Etik kurul onayı 140 yavru fare için alınmış olup , Moleküler yöntemler için her gruptan toplamda 14 yavru (PN7 için 7 adet, PN28 için 7 adet olmak üzere) fare beyin dokuları tez sunumu sürecine yetiştiremediği için tez sonuçlarına eklenememiştir. Grupların düzenlenişi aşağıdaki gibidir.

1. **Kontrol grubu (K) (n=28):** Standart fare yemi ile beslenen yabanıl tip (Yt) C57BL/6 türü 4 adet altı haftalık dişi fare katımdan önce 3 hafta boyunca standart fare yemi ile beslenmeye devam ettiler. Katım gününden sonra vajinal plak kontrolü yapılarak , vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü kabul edildi ve gebe fareler gebelik ve laktasyon boyunca da SD ile beslenmeye devam etti. Bu gebe farelerden doğan 7 adet yenidoğan fare histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere postnatal (PN) 7. günde (Resim 6) eter anestezisi altında servikal dekapitasyon uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek ; beyin dokuları alınmıştır(Resim 7). Bu gebelerden doğan diğer 7 yavru ise PN28. günde eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş, kraniotomi ile beyinleri çıkarılmış ve histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere tüm beyin dokusu alınmıştır.
2. **Kontrol+LPS grubu (K+LPS) (n=28):** Standart fare yemi ile beslenen yabanıl tip (Yt) C57BL/6 türü 4 adet altı haftalık dişi fare katımdan önce 3 hafta boyunca standart fare yemi ile beslenmeye devam ettiler. Katım gününden sonra vajinal plak kontrolü yapılarak , vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü kabul edildi ve gebe fareler gebelik ve laktasyon boyunca da SD ile beslenmeye devam etti. Bu gebe farelerden doğan 14 adet yenidoğan fareye PN4.günden 6. Güne kadar intraperitoneal (L2630, Sigma Aldrich) 6 mg/kg LPS enjeksiyonu yapılmıştır. 7 yavru histolojik yöntemlerde

kullanılmak üzere PN 7. günde eter anestezisi altında servikal dekapitasyon uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek ; beyin dokuları alınmıştır. Bu gebelerden doğan diğer 7 yavru ise PN28. günde eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş, kraniotomi ile beyinleri çıkarılmış ve histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere tüm beyin dokusu alınmıştır.

3. Doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet ile beslenen grup (DYA-YYD)

(n=28): Standart fare yemi ile beslenen yabanıl tip (Yt) C57BL/6 türü 4 adet altı haftalık dişi fare katımdan önce 3 hafta boyunca diyetten gelen enerjinin %50 sinin yağdan geldiği; doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet yemi ile beslendi. Katım gününden sonra vajinal plak kontrolü yapılarak , vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü kabul edildi ve gebe fareler gebelik ve laktasyon boyunca da **DYA/YYD** ile beslenmeye devam etti. Bu gebe farelerden doğan 7 adet yenidoğan fare histolojik ve moleküler yöntemlerde kullanılmak üzere PN 7. günde eter anestezisi altında servikal dekapitasyon uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek ; beyin dokuları alınmıştır. Bu gebelerden doğan diğer 7 yavru ise PN28. günde eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş, kraniotomi ile beyinleri çıkarılmış ve histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere tüm beyin dokusu alınmıştır.(Resim 5)

4. Doymamış yağ asitlerinden zengin (Omeg6/Omega3:20/1 olan) yüksek yağlı diyet ile beslenen grup (O6/O3:20/1-YYD) (n=28):

Standart fare yemi ile beslenen yabanıl tip (Yt) C57BL/6 türü 4 adet altı haftalık dişi fare katımdan önce 3 hafta boyunca diyetten gelen enerjinin %50 sinin yağdan geldiği; doymamış yağ asitlerinden zengin (Omeg6/Omega3 oranı 20/1 olacak şekilde hazırlanmış yüksek yağlı diyet) olan yüksek yağlı diyet yemi ile beslendi. Katım gününden sonra vajinal plak kontrolü yapılarak , vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü kabul edildi ve gebe fareler gebelik ve laktasyon boyunca da **O6/O3:20/1-YYD** ile beslenmeye devam etti. Bu gebe farelerden doğan 7 adet yenidoğan fare histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere PN 7. günde eter anestezisi altında servikal dekapitasyon uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek ; beyin dokuları alınmıştır. Bu gebelerden doğan diğer 7 yavru ise PN28. günde eter anestezisi altında servikal

dislokasyon ile sakrifiye edilmiş, kraniotomi ile beyinleri çıkarılmış ve histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere tüm beyin dokusu alınmıştır.(Resim 5)



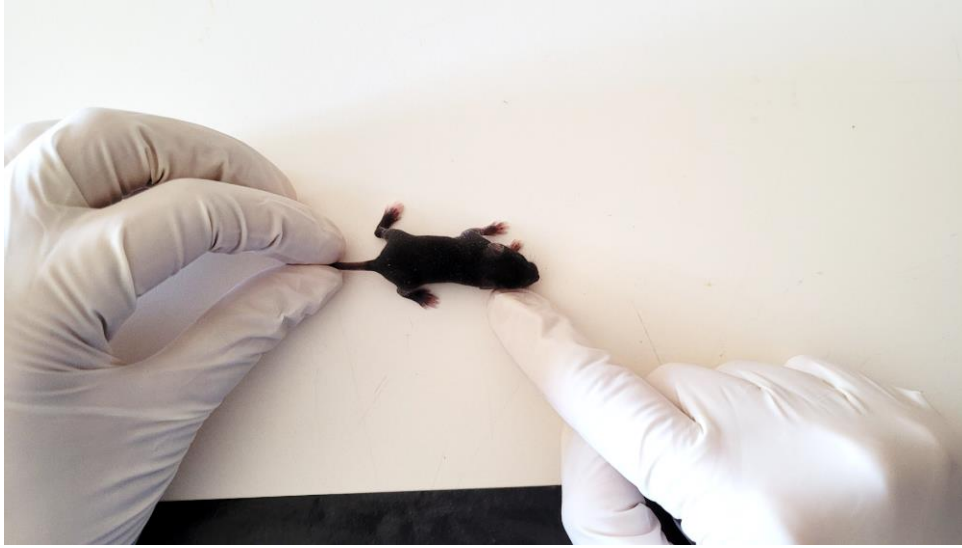
Resim 5 : DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD yem grupları ve her biri ayrı kafeste tutulan dişi fareler

5. **Doymamış yağ asitlerinden zengin (Omeg6/Omega3:2/1 olan) yüksek yağlı diyet ile beslenen grup (O6/O3:2/1-YYD) (n=28):** Standart fare yemi ile beslenen yabanıl tip (Yt) C57BL/6 türü 4 adet altı haftalık dişi fare katımdan önce 3 hafta boyunca diyetten gelen enerjinin %50 sinin yağdan geldiği; doymamış yağ asitlerinden zengin (Omeg6/Omega3 oranı 2/1 olacak şekilde hazırlanmış yüksek yağlı diyet) olan yüksek yağlı diyet yemi ile beslendi. Katım gününden sonra vajinal plak kontrolü yapılarak , vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü kabul edildi ve gebe fareler gebelik ve laktasyon boyunca da **O6/O3:2/1-YYD** ile beslenmeye devam etti. Bu gebe farelerden doğan 7 adet yenidoğan fare histolojik

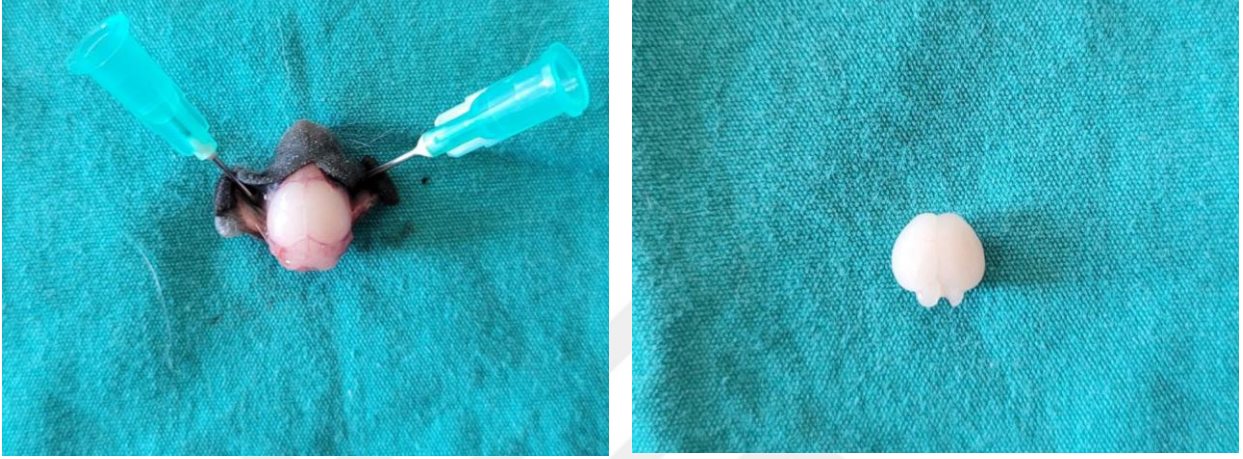
yöntemlerde kullanılmak üzere PN 7. günde eter anestezisi altında servikal dekapitasyon uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek ; beyin dokuları alınmıştır. Bu gebelerden doğan diğer 7 yavru ise PN28. günde eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş, kraniotomi ile beyinleri çıkarılmış ve histolojik yöntemlerde kullanılmak üzere tüm beyin dokusu alınmıştır.

2.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, 20 adet 180-290 gr ağırlığında C57BL/6 türü türü dişi farelerden doğan yavru fareler kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, **C57BL/6 türü** türü dişi fare bulunmasından dolayı ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodunda, 20–22°C oda ısısında standart hayvan oda ve kafeslerinde tutuldu. Hayvanlar bekletilmiş musluk suyu ve grubuna uygun yem ile ad libitum beslendi. Deneyde kullanılan istatistiksel analizin anlamlı olması için, her alt grupta 7 fare olacak şekilde planlandı.



Resim 6 : PN7 fare yavruları



Resim 7 : Sakrifikasyon sonrası beyin dokularının görünümü

2.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: 7. ve 28. Günlerdeki NLRP3, IL1 β , Kaspaz-1, Iba-1 seviyeleri

Bağımsız değişken: Kontrol, doymuş yağ asitlerinden zengin , O6/O3:20/1 ve , O6/O3:2/1 olan yüksek yağlı diyetler

2.6. Veri Toplama Araçları

2.6.1. Kullanılan Cihazlar

Araştırmamızda kullanılan cihazlar, demirbaşlar ve dokulardan görüntü elde edilinceye kadarki tüm sarf malzemeler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan cihazlar

Işık mikroskobu	Olympus DP70	Dokuların histomorfolojik incelenmesi
Hassas terazi	Sartorius – GC803S-0CE	Dokular ve çalışmalarda hazırlanan solüsyonlar için tartım işlemlerinde kullanıldı.
+4°C buzdolabı	Ariston – MTB511NFTK	Antikorların, Boya kitlerinin ve solüsyonların saklanması için kullanıldı.
-20°C derin dondurucu	Arçelik – 2031D	Antikorları ve solüsyonları belli bir soğuklukta muhafaza etmek için kullanıldı.
Distile su cihazı	Milipore – TANKMPK01	Distile su ihtiyacı için kullanıldı.
60°C inkübatör	Elektromag – M6040BP	Doku takip aşamalarında ve preparatların deparafinizasyon aşamasında kullanıldı.
Mikrotom	Leica-RM 2255	Deneklerin bloklanmış dokularından kesit almak amacıyla kullanıldı.
37°C inkübatör	Wisecube- Wig-105	Preparatları belli bir ısıda belli bir süre muhafaza etmek ve histolojik kimyasal boyaların bazı adımlarını uygulamak için kullanıldı.
Vorteks cihazı	Velp scientifica - 220220176	Kullanılacak solüsyonları karıştırmak için kullanıldı.
Otomatik pipet seti	Eppendorf, ISOLAB, CAPP autoclavable, Thermo	Reaktifleri hazırlamak ve deney kitlerini uygulanmak için kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı	IKA–RCT classic	Hazırlanmış solüsyonların karıştırılması için kullanıldı.
Su banyosu (mikrotom için)	Termofin-3000459	Mikrotom ile kesit alırken parafinin belli bir ısıda erimesi ve dokunun lama buruşmadan alınmasını sağlamak için kullanıldı.
Santrifüj cihazı	Sigma,1-14	Dokulardaki süpernatantı ayırabilmek amacıyla kullanıldı.
Mikrodalga cihazı	Galanz – WP800J20-2	Sitrat tamponu içerisindeki dokuları belirli bir süre ve ısıda sitrata maruz bırakmak için kullanıldı.

2.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Projede kullanılan sarf malzemeler şırınga, pastör pipeti, steril gaz kompres, lam, lamel, vajinal smear çubuğu, kağıt havlu, cryo tüp, entellan, çelik ve plastik doku takip/parafin kaseti, beher, erlen, mezür (dereceli silindir), deney tüpü, huni, parafilm, parafin, petri kutusu, eldiven, çalar saat, manyetik balık, manyetik balık tutucu, bistüri ve ucu, plastik deney tüpü, cerrahi set, mikropipet ucu, numune kabı, plastik pipet, metal ve plastik spatül, tartım kabı, tüp standı, alüminyum folyo, asetat kalemi, kurşun kalem, lam boyama kabı (şale), lam taşıma/saklama kutuları, etiket, dikdörtgen cam kaplar, ependorf tüpü (1,5 ve 2 ml), filtre kağıdı, çelik ve plastik lam sepeti, pipet ucu kutusu.

Kullanılan primer antikorlar ; NLRP3 (Adipogen,AG-20B-0014-C100) , CAS1 (Adipogen, AG-20B-0042-C100) , IL1 β (Santa-Cruz,SC7884), Iba1(Cell-Signaling,17198S). Sekonder antikor için ise Thermo Scientific, Ultravision Detection System ,Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (S21024-5) kullanıldı.

2.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney bitiminde deneklerden elde edilen dokulara rutin doku takibi prosedürü uygulandı, lamlara 5 mikronluk kesitler alındı. Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalar yapıldı. Deneyde yapılan histokimyasal boyamalar; Krezil Viyole; immünohistokimyasal değişiklikler için ve inflamazom aktivasyonunun belirlenebilmesi için NLRP3, IL1 β , kaspaz-1, Iba1 primer antikorları ile immünohistokimya boyamaları yapıldı.

2.6.3.1. Deneklerin Ağırlık Ölçümü

Deneklerin günlük fiziksel değişimleri gözlendi ve deney başlangıcından deney sonuna kadar belirli aralıklarla tartım yapıldı.

2.6.3.2. Histokimyasal Değerlendirmeler

Sakrifikasyon sonrası deneklerin beyinleri %10'luk formolde 2-3 gün bekletilerek fikse edildi. Daha sonra bir gece akarsu altında bekletilerek fiksatifin fazlası uzaklaştırılması sağlandı. Sonraki tüm takip işlemleri 60°C'lik etüvde gerçekleştirildi. Dokular sırasıyla %70, %80 ve

%96'lık etil alkol serilerinde 20 dakika dehidratasyon amacıyla bekletildikten sonra 20'şer dakika 4 farklı aseton serisinden geçirildi. Her birinde 30 dakika duracak şekilde iki ayrı ksilende şeffaflaştırma amacıyla tutuldu. Etüv içindeki erimiş parafin ile 1'er saat ve 2 kez olmak üzere immersiyonu sağlandı. Son olarak dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo3).

Tablo 3: Doku takibi protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formol	48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
Parafin emdirme	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

2.6.3.2.1. Krezil Viyole Boyama Protokolü

Alınan kesitler 1 gece deparafinizasyon için 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki etüvde olmak üzere 20 dakika diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 30 dakika boyunca krezil viyole ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Krezil Viyole Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C Etüv	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen I (etüvde)	20 dk
Deparafinizasyon	Ksilen II (oda ısında)	20 dk
Deparafinizasyon	Ksilen III (oda ısında)	20 dk
Rehidratasyon	%100'lük, % 96'lık alkol, % 80'lik, % 70'lik alkol	1'er dk
Yıkama	Distile su	1 dk
Boyama	Krezil Violet	5 dk
Yıkama	Distile su ve ardından 100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen I	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen II	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen III	20 dk
Kapama	Entellan	

2.6.3.3. Morfometrik Değerlendirmeler

2.6.3.3.1. Beyin Prefrontal Korteks ve Hipokampus Bölgesinde Nöron Sayımı

Prefrontal korteks ve hipokampus kesitleri için Paxinosun fare beyin atlasına göre Plate8-9 ve Plate 22-33 seviyelerinden kesitler alındı. Histomorfometrik incelemeler için deneğe ait preparatlardan prefrontal korteks için x20 büyütmede $59 \mu\text{m}^2$, hipokampüse ait CA1, CA3 ve girus dentatus bölgelerinde x40'lık büyütmede $14 \mu\text{m}^2$ 'lık 5'er alanda Image J programında ölçüm yapıldı ve ortalamaları alındı.

2.6.3.4. İmmünohistokimyasal İncelemeler

2.6.3.4.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü

İmmünohistokimyasal olarak NLRP3, IL1 β , kaspaz-1, Iba-1 primer antikorları kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde bir gece bekletildi sonrasında şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Dokular 5 dakika boyunca mikrodalgada sitrat tampon çözeltisiyle muamele edildi. Soğuyan dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından üç kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika oda ısısında H₂O₂ ile bekletilerek dokuda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 5 dakika bloklama (A) solüsyonu ile bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik NLRP3, IL1 β , kaspaz-1, Iba-1 ile + 4 °C' de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor (B) solüsyonu ile 10 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Biooptica'nın hematoksileni ile ardalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 5).

2.6.3.4.2. İmmunohistokimyasal Skorlama

Gruplar arası bu moleküllerinin dağılımını belirlemek için, beyin dokusunda prefrontal korteks bölgesinde ve hipokampüse ait CA1, CA3 ve girus dentatus bölgelerinde immun pozitif hücre sayımı yapıldı.

İmmunohistokimyasal skorlama için her deneğe ait preparatlardan prefrontal korteks ve hipokampüse ait CA1, CA3 ve girus dentatus bölgelerinde x40'luk büyütmede 5'er alanda 100'er deki pozitif hücre sayısı hesaplandı ve ortalamaları alındı.

Tablo 5: İmmünohistokimyasal boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakia
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dokuların Etrafını Çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Antijen teşhiri	Sitrat (mikrodalgada)	Tamponu 5 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Endojen peroksidaz aktivesinin bloklanması	H ₂ O ₂	10 Dakika
Primer Antikor	NLRP3, IL1-beta, Caspase-1, Iba-1	1 Gece (4°C'de)
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Enzim Kompleksi	Streptavidin Kompleksi	Biyotin 15 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Kromojen	DAB	
Yıkama	Distile Su	Çalkalama

Zemin Boyası	Mayer's Hematoksilen	
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1(x3 değişim)	20 Dakika
Kapama	Entellan	

2.7. İstatistiksel Analiz

Deneklerin gruplar arası ortalama farkları SPSS programında nonparametrik Kruskal Wallis varyans testi kullanılarak değerlendirildi ;ikili gruplar arasındaki istatistikler Menn-Whitney U testi kullanılarak,. $p < 0.05$ değerleri anlamı olarak kabul edildi.

2.8. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca 19/2021 Protokol no ile etik açıdan uygun olduğu bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Yavru Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Tablo 6: Yavru Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

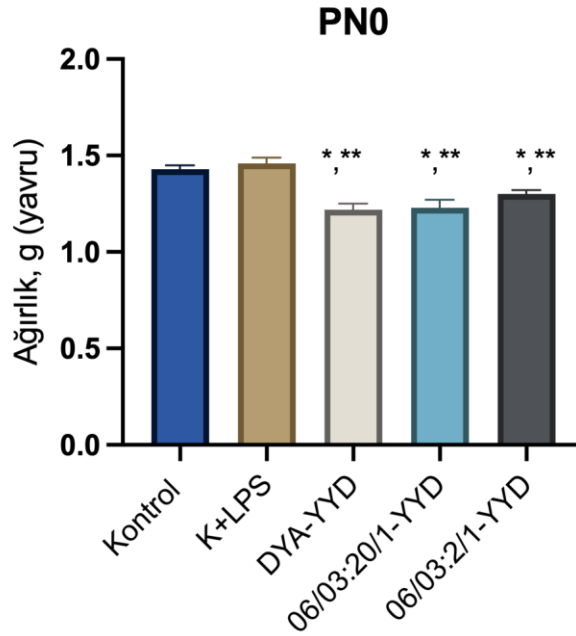
	KONTROL	K+LPS	DYA-YYD	O6/O3:20/1-YYD	O6/O3:2/1-YYD
PN0 YA	1.44 ± 0.026	1.47±0.031	1.23±0.034	1.24±0.049	1.30±0.025
PN7 YA	3.17±0.059	2.44±0.092	3.22±0.086	3.52±0.076	3.62±0.123
PN28 YA	11.03±0.35	10.09±0.52	12.10±0.34	11.56±0.47	13.82±1.03

Deney gruplarının yenidoğan yavrularının 0. , 7. ve 28. gündeki vücut ağırlıkları ölçüldü. PN0 yavru vücut ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubu için 1.44 ± 0.026 , K+LPS grubu için 1.47 ± 0.031 , DYA-YYD grubu için 1.23 ± 0.034 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 1.24 ± 0.049 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 1.30 ± 0.025 olarak ölçüldü. PN7 yavru vücut ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubu için 3.17 ± 0.059 , K+LPS grubu için 2.44 ± 0.092 , DYA-YYD grubu için 3.22 ± 0.086 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 3.52 ± 0.076 , O6/O3:2/1-YYD grubu için ise 3.62 ± 0.123 olarak ölçüldü. PN28 yavru vücut ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubu için 11.03 ± 0.35 , K+LPS grubu için 10.09 ± 0.52 , DYA-YYD grubu için 12.10 ± 0.34 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 11.56 ± 0.47 , O6/O3:2/1-YYD grubu için ise 13.82 ± 1.03 olarak ölçüldü.(Tablo 6)

Tüm gruplar incelendiğinde 0., 7. Ve 28. günde yavru vücut ağırlıkları için anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal-Wallis , $p < 0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

PN0 için yavru vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında ; Kontrol ve K+LPS grupları arasında anlamlı bir fark yoktu($p=0.643$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; PN0 yavru ağırlığı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN0 yavru ağırlığı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$) . Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN0 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.006$). K+LPS grubu ile DYA-YYD grubu

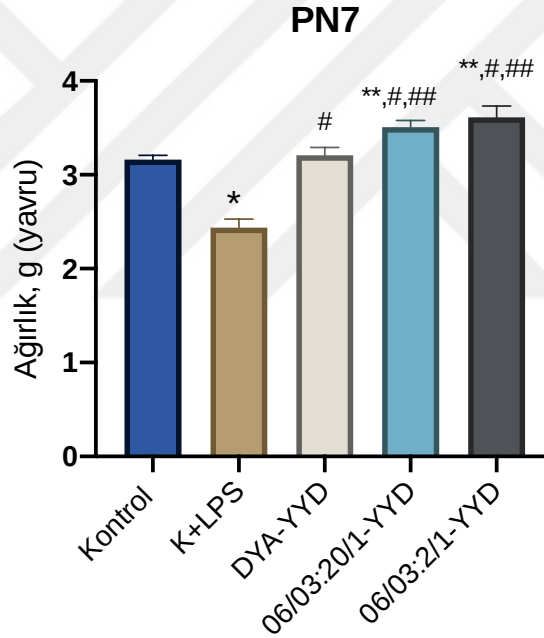
karşılaştırıldığında; PN0 yavru ağırlığı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN0 yavru ağırlığı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN0 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.980$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.051$). O6/O3:20/1-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.296$). (Grafik1)



Grafik 1: PN0 yavru vücut ağırlıkları. * : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , **:K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN7 için yavru vücut ağırlıkları karşılaştırıldı. Kontrol ile K+LPS grubu karşılaştırıldığında; PN7 yavru ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.44$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru ağırlığı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.02$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p<0.001$). K+LPS grubu ile

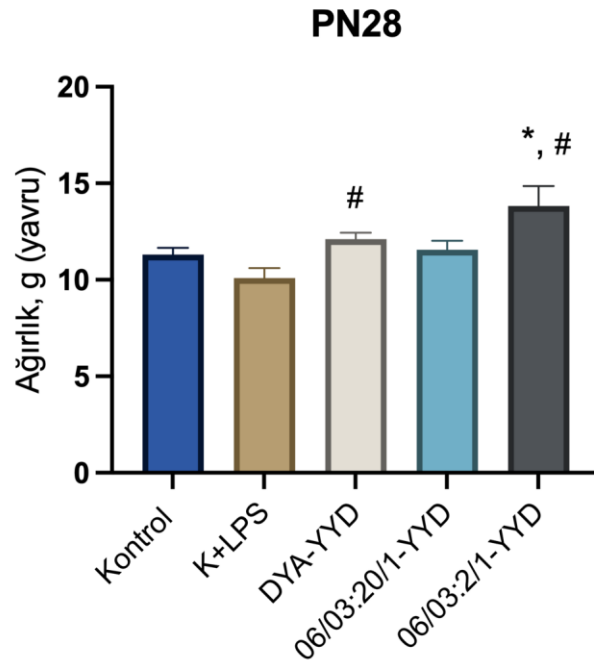
DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; PN7 yavru ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; PN7 yavru ağırlığı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.007$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; PN7 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.005$). O6/O3:20/1-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.236$). (Grafik 2)



Grafik 2: PN7 yavru vücut ağırlıkları. */**Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , ## : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN28 için yavru vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında ; Kontrol ve K+LPS grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.197$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.05$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.35$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN28 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.02$). K+LPS grubu ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; PN28 yavru ağırlığı DYA-YYD

grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.01$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.06$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN28 yavru ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.008$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.28$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.18$). O6/O3:20/1-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.07$). (Grafik 3)



Grafik 3: PN28 yavru vücut ağırlıkları. * : Kontrole grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

3.2. Yavru Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması

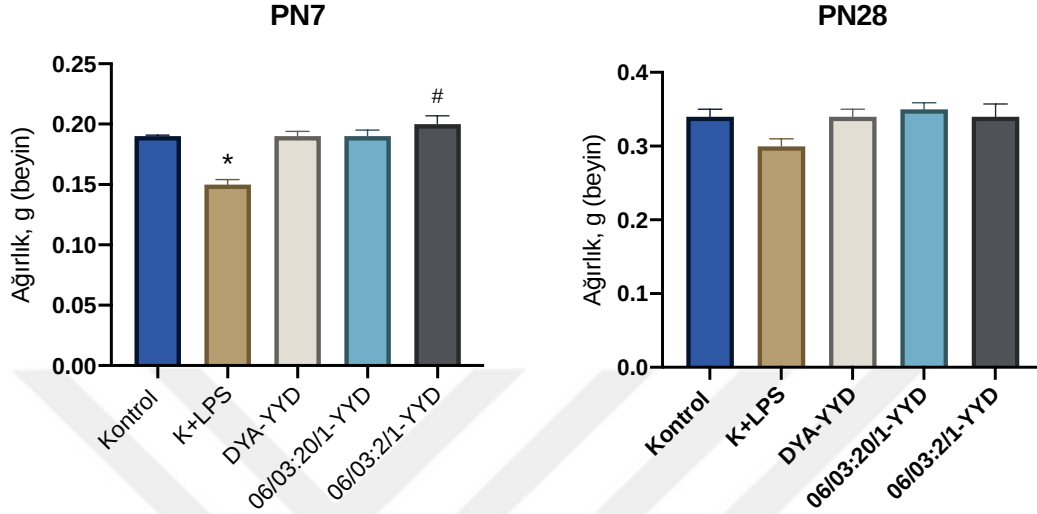
Tablo 7: Yavru Beyin Ağırlıklarının Karşılaştırılması

	KONTROL	K+LPS	DYA-YYD	O6/O3:20/1-YYD	O6/O3:2/1-YYD
PN7 BA	0.19 ± 0.001	0.15±0.004	0.19±0.006	0.19±0.005	0.20±0.007
PN28 BA	0.34±0.01	0.30±0.01	0.34±0.01	0.35±0.09	0.34±0.01

Deney gruplarının 7. ve 28. günde sakrifiye edilen yavrularının beyin ağırlıkları ölçüldü. PN7 yavru beyin ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubu için 0.19 ± 0.001 , K+LPS grubu için 0.15 ± 0.004 , DYA-YYD grubu için 0.19 ± 0.006 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 0.19 ± 0.005 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 0.20 ± 0.007 olarak ölçüldü. PN28 yavru beyin ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubu için 0.34 ± 0.01 , K+LPS grubu için 0.30 ± 0.01 , DYA-YYD grubu için 0.34 ± 0.01 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 0.35 ± 0.09 , O6/O3:2/1-YYD grubu için ise 0.34 ± 0.01 olarak ölçüldü.(Tablo7)

Tüm gruplar incelendiğinde 7. günde yavru beyin ağırlıkları için anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal-Wallis , $p < 0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi. PN7 için yavru beyin ağırlıkları karşılaştırıldı. Kontrol ile K+LPS grubu karşılaştırıldığında; PN7 beyin ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.837$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.800$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 beyin ağırlığı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.034$). K+LPS grubu ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; PN7 yavru beyin ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru beyin ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$) . K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında PN7 yavru beyin ağırlığı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.770$). DYA-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.205$). O6/O3:20/1-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0.100$).

28. günde tüm gruplar incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (Kruskal-Wallis , $p=0.32$) .(Grafik4-5)



Grafik 4-5 : PN7 ve PN28 yavru beyin ağırlıkları. *: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, # : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

3.3. PN7 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları

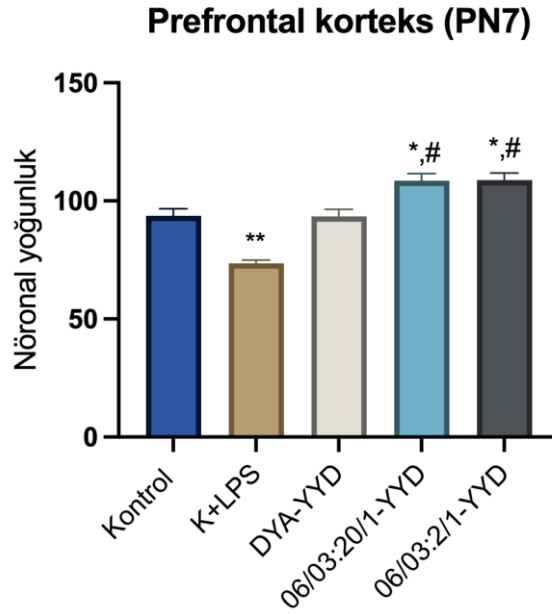
Tablo 8: PN7 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları

PN7	KONTROL	K+LPS	DYA-YYD	O6/O3:20/1-YYD	O6/O3:2/1-YYD
CA1	85.7±4.03	71.5±2.99	73.1±3.57	89.1±2.47	93.8±3.12
CA3	85.1±2.54	65.7±2.28	65.7±2.57	73.1±4.78	78.2±4.53
GD	191.2±4.87	149.8±4.62	163.5±6.54	165.4±4.70	166.7±6.53
PREF	93.7±2.98	73.5±1.48	93.4±3.09	108.6±2.97	108.8±3.00

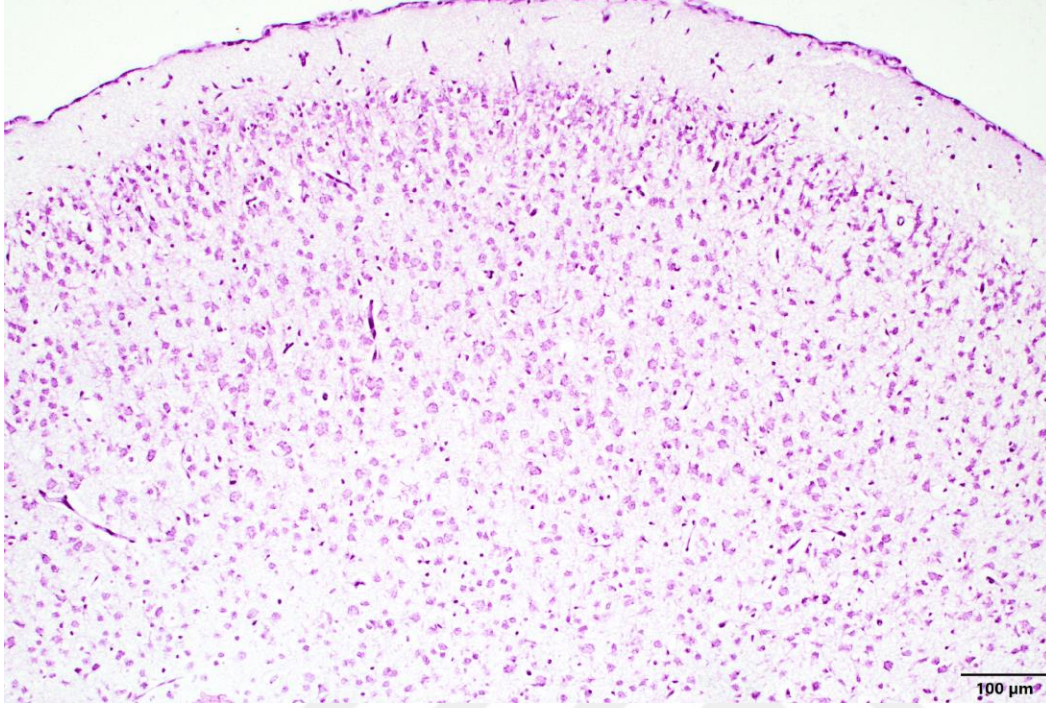
Deney gruplarının prefrontal korteks ve hipokampus (CA1 , CA3, GD bölgeleri) nöron sayımları 7. gün (PN7) için yapıldı.

PN7 prefrontal korteks nöron sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ile yapılan analiz için; $p<0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi. Kontrol grubunda prefrontal korteks nöron sayısı ortalaması 93.7 ± 2.98 ; K+LPS grubunda 73.5 ± 1.48 ; DYA-YYD grubunda 93.4 ± 3.09 ; O6/O3:20/1-YYD grubunda 108.6 ± 2.97 , O6/O3:2/1-YYD grubunda 108.8 ± 3.00 olarak hesaplandı (Tablo8)(Figür 1).

Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.914$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.005$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p < 0.001$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p < 0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p < 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.006$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.814$). (Grafik 6)



Grafik 6: PN7 Prefrontal Korteks nöron sayımı. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık



Figür 1 : PN7 Prefrontal Korteks Krezil Viyole

PN7 hipokampus CA1, CA3 ve GD bölgeleri için nöron sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ile yapılan analiz için sırasıyla ; $p=0.001/ p=0.003/ p=0.003$) . Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise üç bölge için de Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

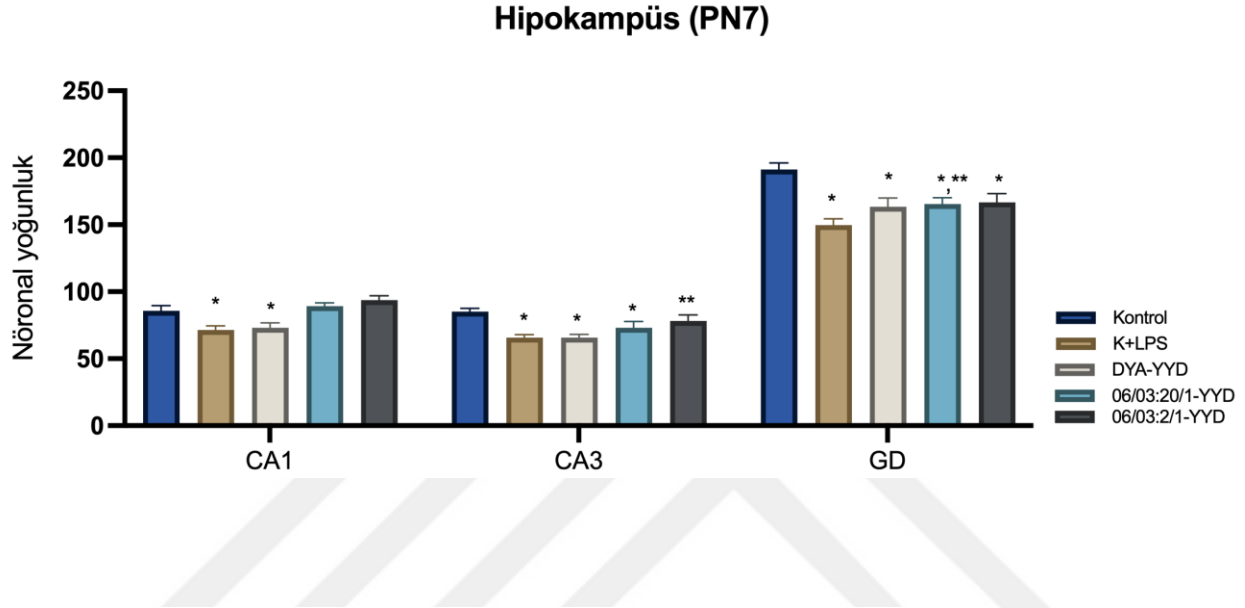
CA1 bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 85.7 ± 4.03 , K+LPS grubu için 71.5 ± 2.99 , DYA-YYD grubu için 73.1 ± 3.57 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 89.1 ± 2.47 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 93.8 ± 3.12 olarak bulundu (Tablo 8) . Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.018$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında ; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.048$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD ve O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında her iki grup için de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla ; $p=0.370$, $p=0.125$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.749$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.003$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı

($p=0.007$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.224$). (Grafik7)

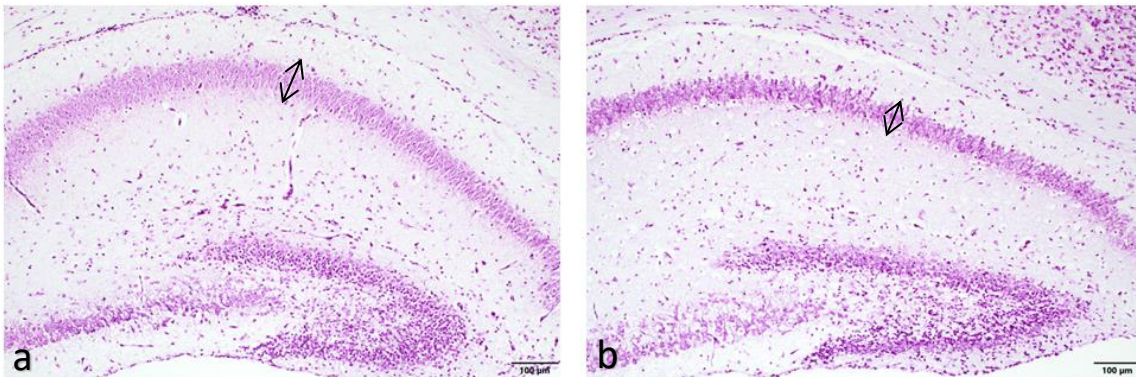
CA3 bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 85.1 ± 2.54 , K+LPS grubu için 65.7 ± 2.28 , DYA-YYD grubu için 65.7 ± 2.57 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 73.1 ± 4.78 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 78.2 ± 4.53 olarak bulundu (Tablo8). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında ; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.004$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.048$). Kontrol grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.141$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=1.000$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.224$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.013$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.224$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.021$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.201$). (Grafik 7)

GD bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 191.2 ± 4.87 , K+LPS grubu için 149.8 ± 4.62 , DYA-YYD grubu için 163.5 ± 6.54 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 165.4 ± 4.70 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 166.7 ± 6.53 olarak bulundu (Tablo 8). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında ; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.009$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.004$). Kontrol grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.018$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.141$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.035$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.085$). DYA-YYD ile

O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.898$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.654$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.655$). (Grafik7)(Figür 2)



Grafik 7: PN7 Hipokampus nöron sayımı . CA1 için ; * : Kontrol , O6/O3:20/1-YYD ve O6/O3:2/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık . CA3 için; * : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , ** : K+LPS ve DYA-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için; * : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , **: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık



Figür 2 : PN7 Hipokampus Krezil Viyole a.Kontrol grubu b. Özellikle K+LPS ve DYA-YYD gruplarında belirgin azalmış nöron yoğunluğu

3.4. PN28 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları

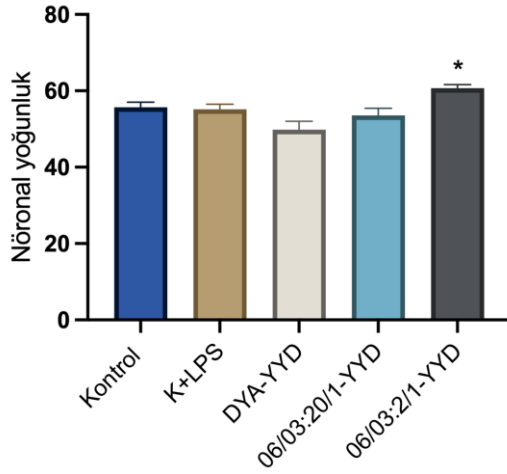
Tablo 9: PN28 Prefrontal Korteks ve Hipokampus nöron sayımları

PN28	KONTROL	K+LPS	DYA-YYD	O6/O3:20/1-YYD	O6/O3:2/1-YYD
CA1	52.2±1.04	44.09±1.49	44.3±0.93	52.9±1.45	51.8±0.82
CA3	48.8±1.59	42.9±1.44	39.6±1.11	40.85±1.83	49.42±2.14
GD	120.6±3.02	93.3±2.26	108.3±3.18	116.9±2.52	117.2±2.65
PREF	55.71±1.32	55.14±1.33	49.85±2.16	53.57±1.88	60.71±0.91

Deney gruplarının prefrontal korteks ve hipokampus (CA1 , CA3, GD bölgeleri) nöron sayımları 28. gün (PN28) için de yapıldı.

PN28 prefrontal korteks nöron sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ile yapılan analiz için; $p=0.005$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi. Kontrol grubunda prefrontal korteks nöron sayısı ortalaması 55.71 ± 1.32 ; K+LPS grubunda 55.14 ± 1.33 ; DYA-YYD grubunda 49.85 ± 2.16 ; O6/O3:20/1-YYD grubunda 53.57 ± 1.88 , O6/O3:2/1-YYD grubunda 60.71 ± 0.91 olarak hesaplandı (Tablo 9). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.797$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.054$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.370$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.017$). K+LPS ile DYA-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.108$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.404$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.015$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.249$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.015$). (Grafik 8)

Prefrontal korteks (PN28)



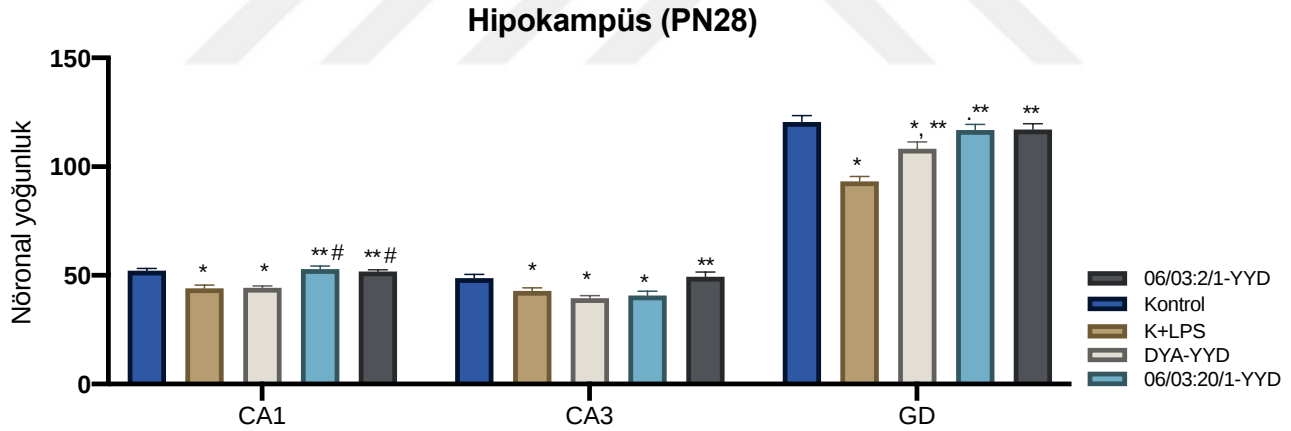
Grafik 8: PN28 Prefrontal Korteks nöron sayımı.

*: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN28 hipokampus CA1, CA3 ve GD bölgeleri için nöron sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ile yapılan analiz için $p < 0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise üç bölge için de Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi. CA1 bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 52.2 ± 1.04 , K+LPS grubu için 44.09 ± 1.49 , DYA-YYD grubu için 44.3 ± 0.93 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 52.9 ± 1.45 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 51.8 ± 0.82 olarak bulundu (Tablo 9). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD ve O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında her iki grup için de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.566$, $p = 0.920$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.800$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p = 0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p = 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p < 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p < 0.001$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.540$). (Grafik 9)

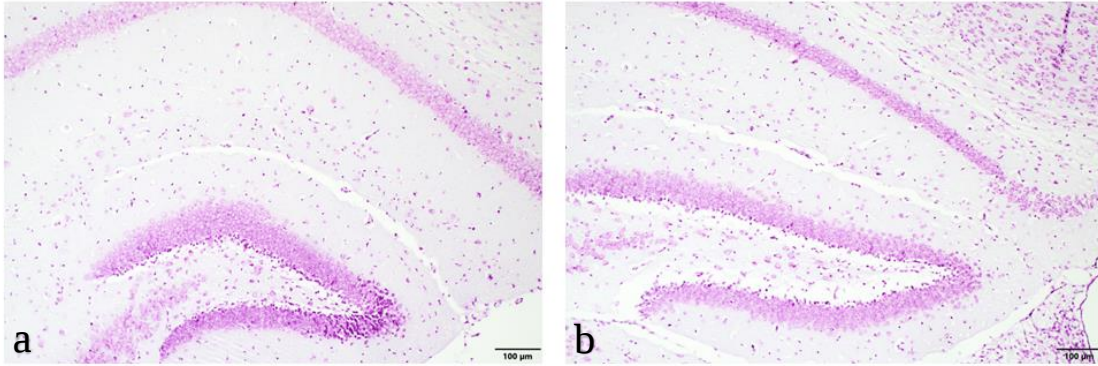
CA3 bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 48.8 ± 1.59 , K+LPS grubu için 42.9 ± 1.44 , DYA-YYD grubu için 39.6 ± 1.11 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 40.85 ± 1.83 , O6/O3:2/1-YYD

grubu için 49.42 ± 2.14 olarak bulundu (Tablo 9). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında ; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.001$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.017$) . Kontrol grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.764$). K+LPS ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.123$) . K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.549$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p=0.030$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.684$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında nöron sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.020$). (Grafik 9)



Grafik 9 : PN28 Hipokampus nöron sayımı . CA1 için ; * : Kontrole grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , ** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık . CA3 için ; * : Kontrole grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , ** : K+LPS ,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için ; * : Kontrole grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ,** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

GD bölgesi nöron sayım ortalamaları kontrol grubu için 120.6 ± 3.02 , K+LPS grubu için 93.3 ± 2.26 , DYA-YYD grubu için 108.3 ± 3.18 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 116.9 ± 2.52 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 117.2 ± 2.65 olarak bulundu (Tablo 9). Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında; nöron sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.015$). Kontrol grubu ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.800$). Kontrol grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.650$). K+LPS ile DYA-YYD grubu nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p = 0.001$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p < 0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında nöron sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak daha azdı ($p < 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.600$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.086$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.91$). (Grafik 9) (Figür3)



Figür 3: PN28 Hipokampus Krezil Viyole (a.Kontrol Grubu b. K+LPS Grubu)

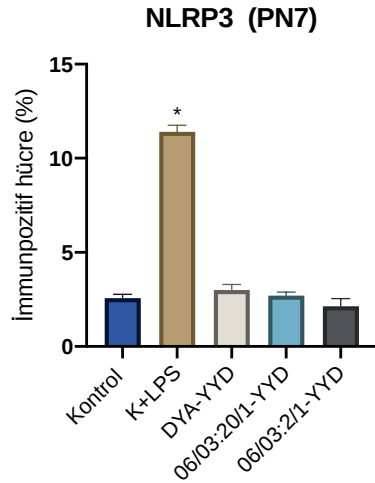
3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Deney gruplarının prefrontal korteksi ve hipokampus (CA1, CA3, GD) bölgeleri immünohistokimyasal olarak NLRP3, kaspaz-1, IL1 β ve Iba1 primer antikorları ile 7. ve 28. günler için değerlendirildi.

3.5.1. PN7 Prefrontal Korteks ve Hipokampus İmmünohistokimyasal Sonuçları

PN7 Prefrontal korteks immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; tüm antikorlar için ; $p<0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

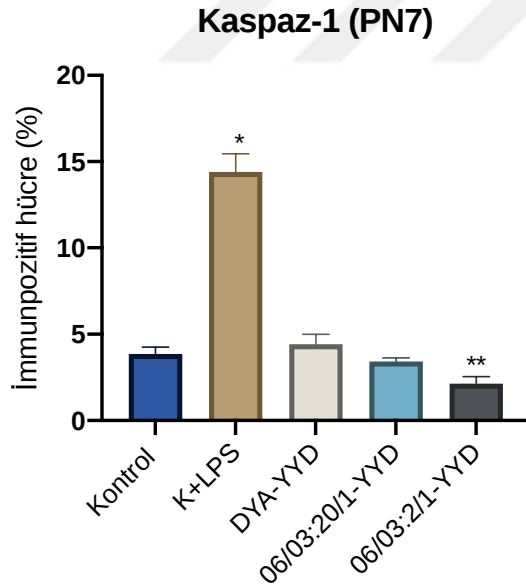
PN7 Prefrontal korteks NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.57 ± 0.20 , K+LPS grubu için 11.43 ± 0.37 , DYA-YYD grubu için 3.00 ± 0.31 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 2.71 ± 0.18 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.14 ± 0.40 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile DYA-YYD , O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla ; $p=0.293,p=0.591,p=0.275$) . K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p=0.002, p=0.001, p=0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.473$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.111$). O6/O3:20/1-YYD grubu ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı($p=0.172$). (Figür1,Grafik 10)



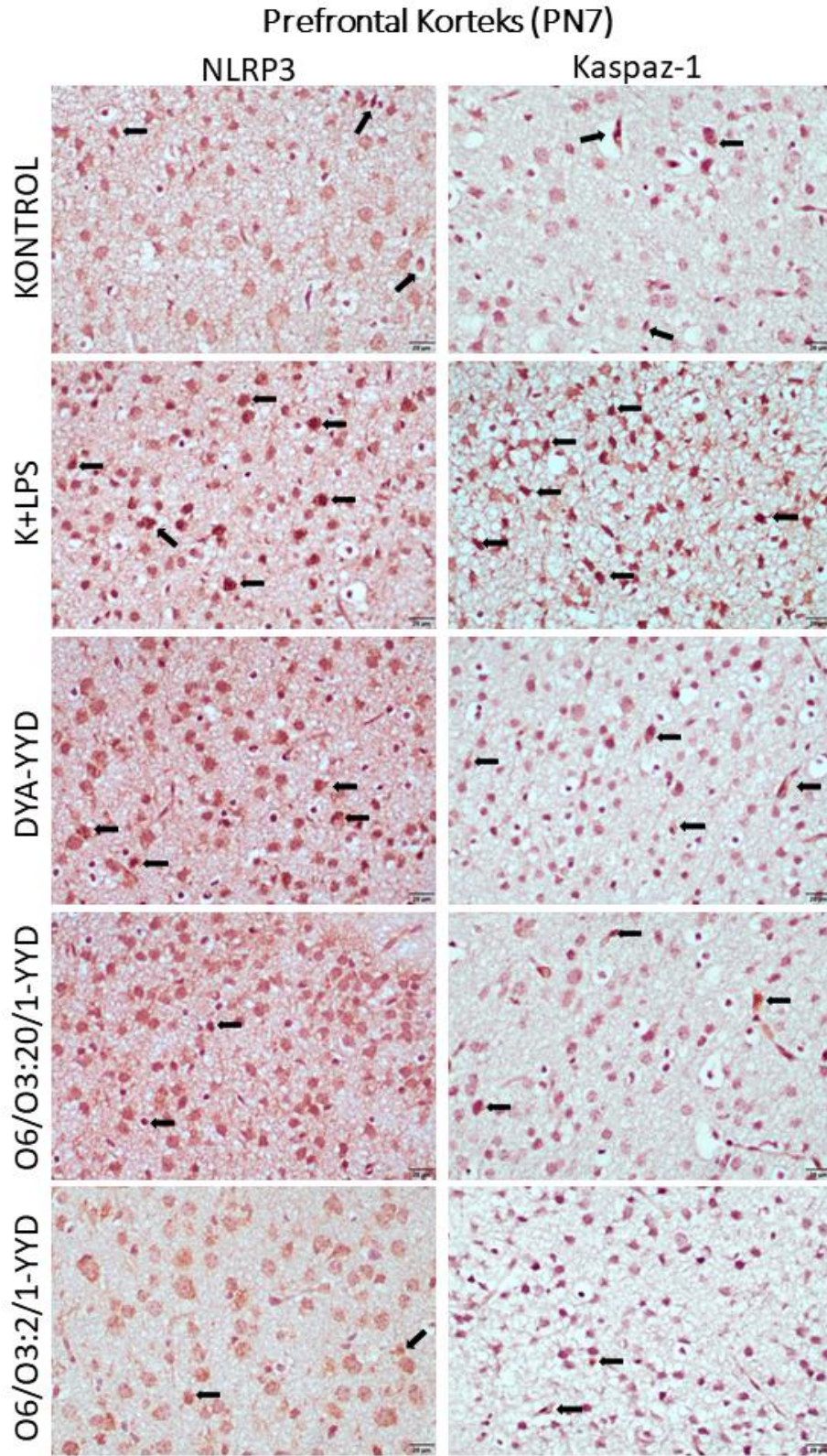
Grafik 10: PN7 Prefrontal Korteks NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları . *: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN7 Prefrontal korteks kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.85 ± 0.40 , K+LPS grubu için 14.4 ± 1.06 , DYA-YYD grubu için 4.42 ± 0.57 , O6/O3:20/1-YYD

grubu için 3.42 ± 0.20 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.14 ± 0.40 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD , O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.688, p=0.275$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.018$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.002, p = 0.001, p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.165$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.024$). (Figür1, Grafik 11)

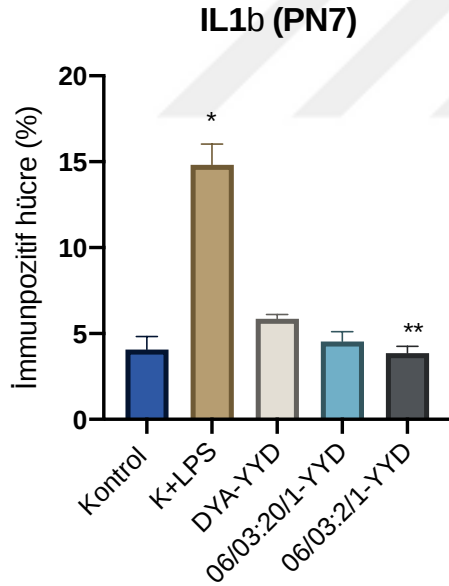


Grafik 11: PN7 Prefrontal Korteks Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. *: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık



Figür 4:PN7 Prefrontal Korteks NLRP3 ve Kaspaz-1. İmmünopozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.

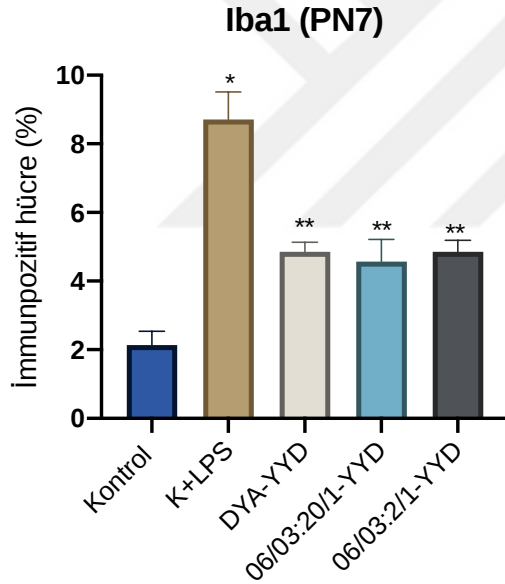
PN7 Prefrontal korteks IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.00 ± 0.75 , K+LPS grubu için 14.8 ± 1.20 , DYA-YYD grubu için 5.85 ± 0.26 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.54 ± 0.57 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.85 ± 0.40 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.051, p=0.650, p=0.649$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.087$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.468$). (Figür2, Grafik 12)



Grafik 12: PN7 Prefrontal Korteks IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları. *: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

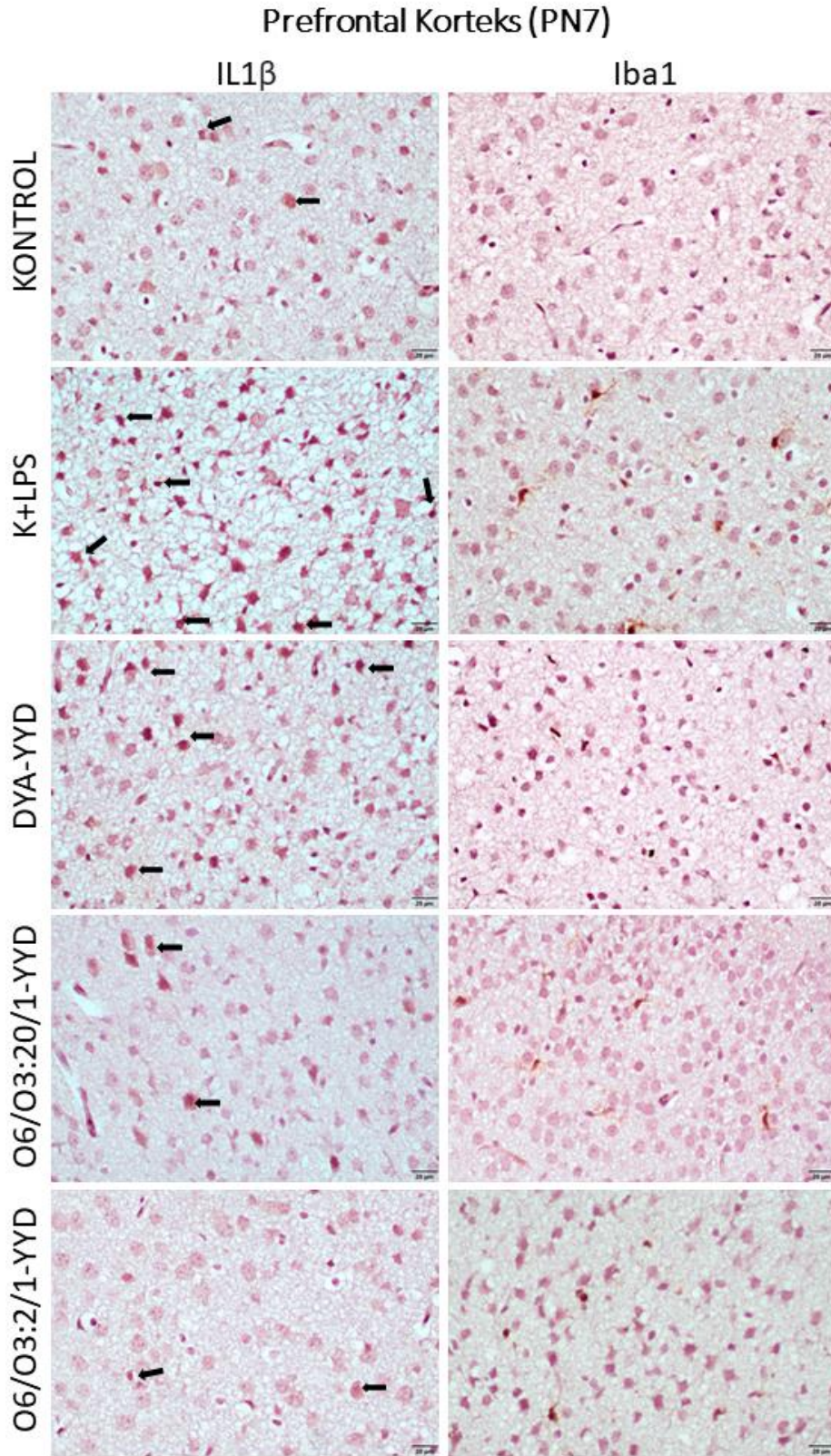
PN7 Prefrontal korteks Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.14 ± 0.40 , K+LPS grubu için 8.71 ± 0.80 , DYA-YYD grubu için 4.85 ± 0.28 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.57 ± 0.64 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.85 ± 0.34 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$).

Kontrol ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.008$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.003$). K+LPS ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.002$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.008$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.003$). DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla ; $p=0.312$, $p=0.945$, $p=0.389$). (Figür2,Grafik 13)



Grafik 13: PN7 Prefrontal Korteks Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları . *: Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

PN7 hipokampus CA1 bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; NLRP3: $p<0.001$, kaspaz-1: $p<0.001$, IL1 β : $p<0.001$, Iba1: $p=0.006$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

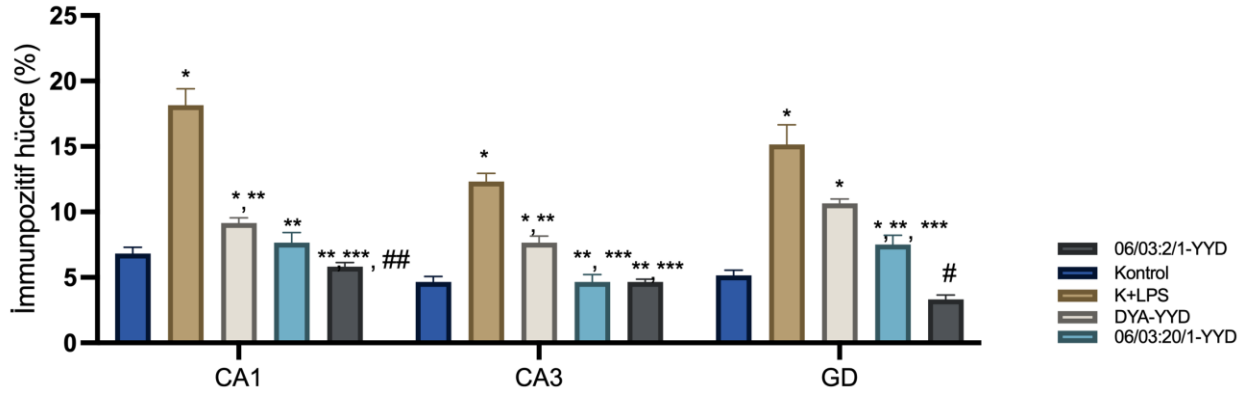


Figür 5 : PN7 Prefrontal Korteks IL1 β ve Iba1. İmmünpozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.

PN7 hipokampus CA1 bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 6.83 ± 0.48 , K+LPS grubu için 18.17 ± 1.25 , DYA-YYD grubu için 9.17 ± 0.40 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.67 ± 0.76 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 5.83 ± 0.31 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.008$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.508$, $p = 0.115$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.004$, $p = 0.004$, $p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.100$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.037$). (Figür 3, Grafik 14)

PN7 hipokampus CA1 bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 6.66 ± 0.49 , K+LPS grubu için 17.6 ± 1.67 , DYA-YYD grubu için 8.83 ± 0.40 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.50 ± 0.84 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 5.66 ± 0.21 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.012$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.510$, $p = 0.120$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.004$, $p = 0.005$, $p = 0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.134$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.065$). (Figür 4, Grafik 15)

NLRP3 (PN7)



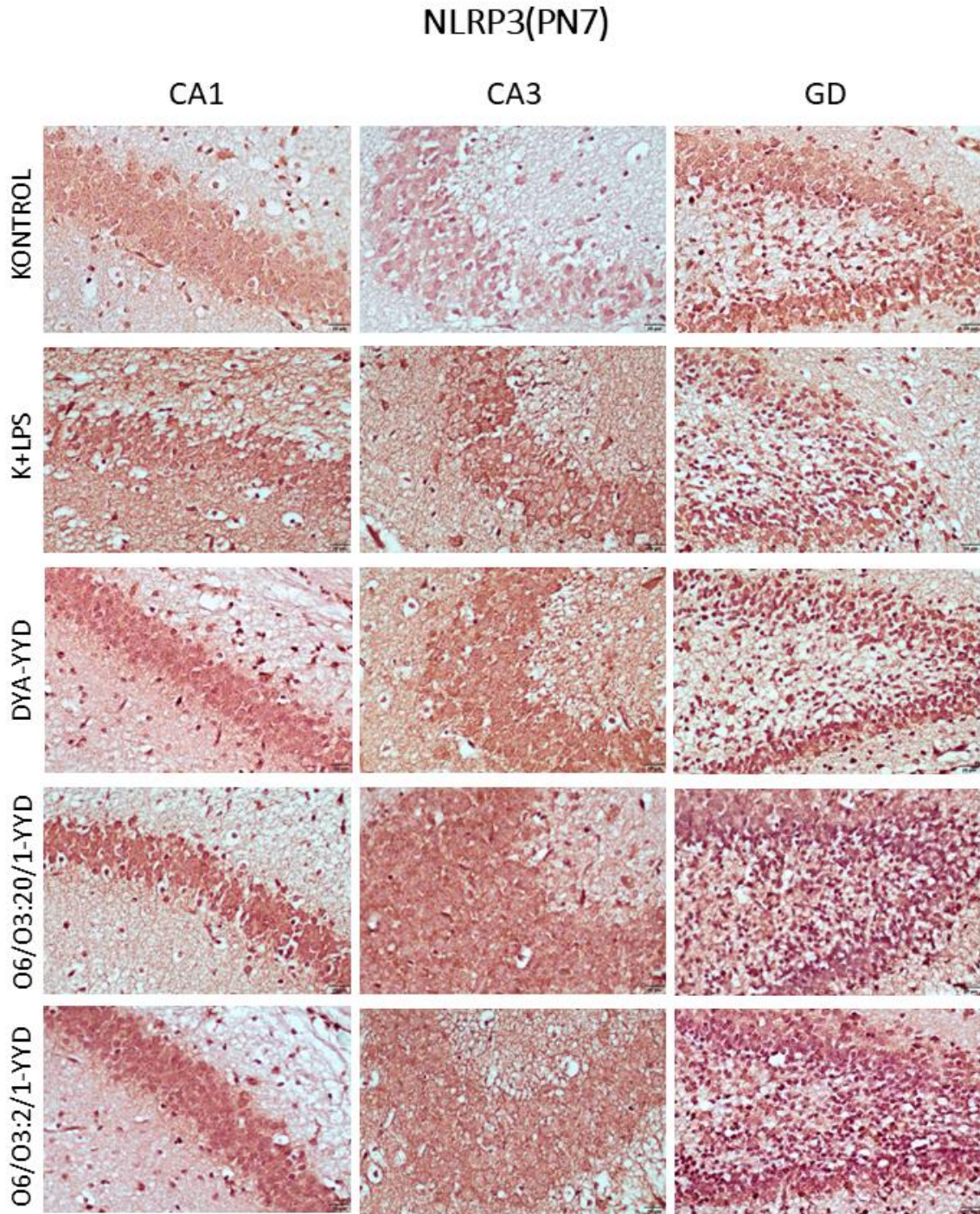
Grafik 14: PN7 Hipokampus NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , ## : O6/O3:20/1-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

PN7 hipokampus CA1 bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.83 ± 0.65 , K+LPS grubu için 20.33 ± 0.80 , DYA-YYD grubu için 12.66 ± 0.88 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.66 ± 0.84 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.33 ± 0.84 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.953, p=0.415$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak

azalmıştı ($p = 0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.808$). (Figür 5, Grafik 16)

PN7 hipokampus CA1 bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 10.50 ± 0.76 , K+LPS grubu için 14.50 ± 1.64 , DYA-YYD grubu için 11.16 ± 1.01 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 10.66 ± 0.88 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.00 ± 0.36 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.685, p=0.936, p=0.808$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (hepsi için; $p = 0.004$). DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunmadı (sırasıyla; $p=0.685, p=0.517, p=0.808$). (Figür 6, Grafik 17)

PN7 hipokampus CA3 bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; NLRP3: $p<0.001$, kaspaz-1: $p<0.001$, IL1 β : $p<0.001$, Iba1: $p=0.004$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.



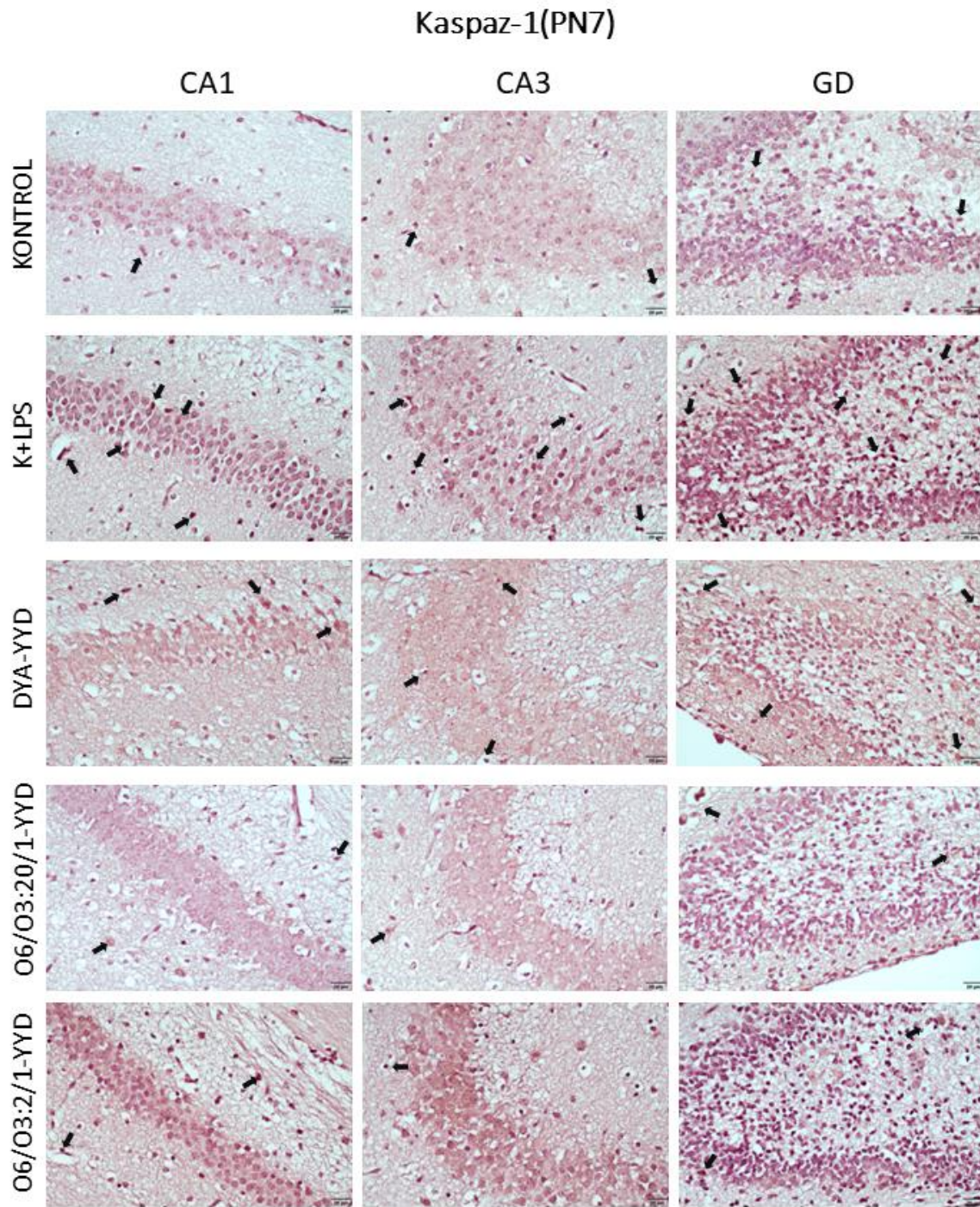
Figür 6: PN7 Hipokampus NLRP3

PN7 hipokampus CA3 bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.67 ± 0.42 , K+LPS grubu için 12.33 ± 0.61 , DYA-YYD grubu için 7.67 ± 0.49 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.67 ± 0.56 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.67 ± 0.21 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.003$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.003$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.801$, $p = 0.857$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.004$, $p = 0.004$, $p = 0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.008$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.727$). (Figür 3, Grafik 14)

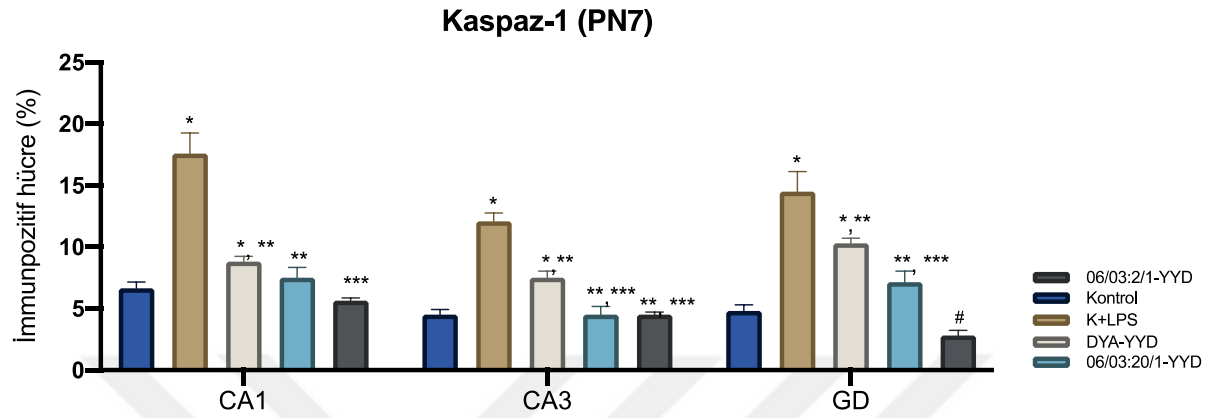
PN7 hipokampus CA3 bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.5 ± 0.42 , K+LPS grubu için 12.1 ± 0.65 , DYA-YYD grubu için 7.50 ± 0.56 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.5 ± 0.67 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.5 ± 0.22 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.005$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 1.000$, $p = 1.000$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.005$, $p = 0.004$, $p = 0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.011$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 1.000$). (Figür 4, Grafik 15)

PN7 hipokampus CA3 bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.83 ± 0.65 , K+LPS grubu için 11.33 ± 0.84 , DYA-YYD grubu için 8.33 ± 0.61 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.16 ± 0.40 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.33 ± 0.33 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.680, p=0.503$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p=0.019, p = 0.004, p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.155$). (Figür 5, Grafik 16)

PN7 hipokampus CA3 bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 7.83 ± 0.95 , K+LPS grubu için 17.66 ± 0.88 , DYA-YYD grubu için 9.5 ± 0.92 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 8.33 ± 1.15 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 8.00 ± 0.52 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD ,O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.685, p=0.747, p=0.808$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (hepsi için; $p = 0.004$). DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunmadı (sırasıyla ; $p=0.466, p=0.113, p=0.935$). (Figür 6, Grafik 17)



Figür 7: PN7 Hipokampus Kaspaz-1. İmmünpozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.

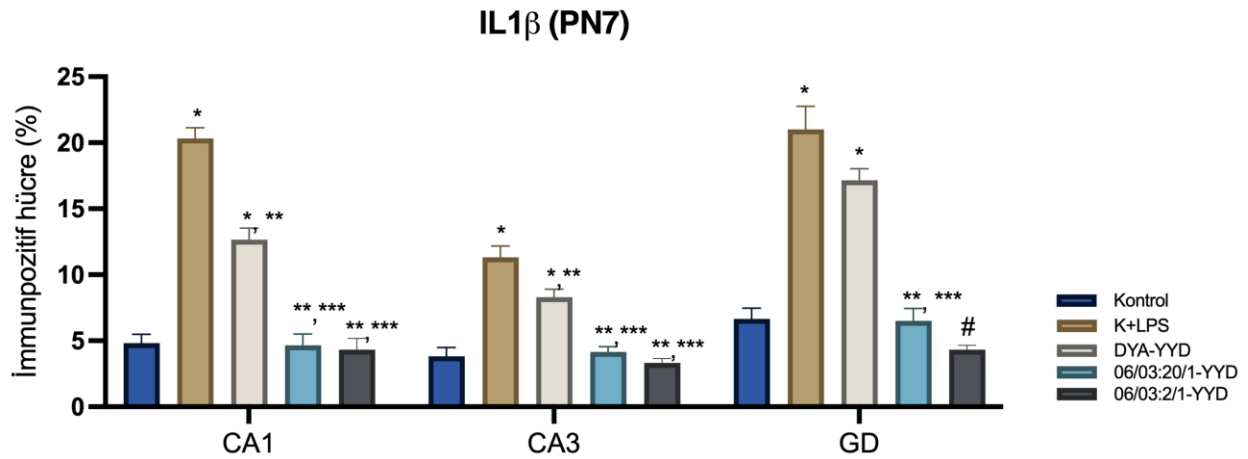


Grafik 15: PN7 Hipokampus Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

PN7 hipokampus GD bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayılarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; NLRP3: $p<0.001$, kaspaz-1: $p<0.001$, IL1 β : $p<0.001$, Iba1 : $p=0.006$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

PN7 hipokampus GD bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 5.17 ± 0.40 , K+LPS grubu için 15.17 ± 1.49 , DYA-YYD grubu için 10.67 ± 0.33 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.5 ± 0.72 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.33 ± 0.33 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.003$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.021$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre

sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.012$). K+LPS ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.050$). K+LPS grubu ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu iki gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p=0.004$, $p=0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.007$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.003$). (Figür 3, Grafik 14)



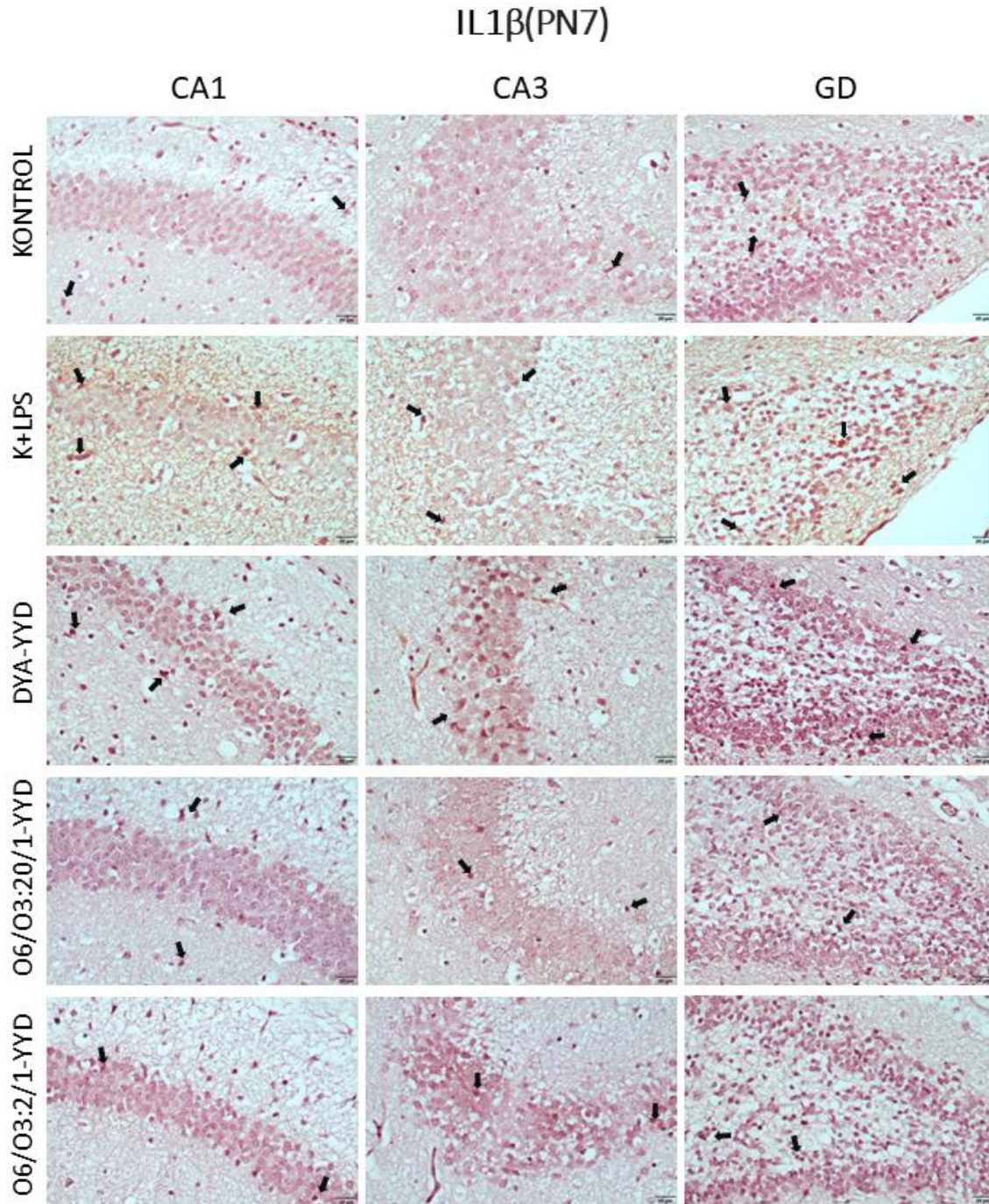
Grafik 16: PN7 Hipokampus IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, *** : DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ***: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, **: K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ***: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , # : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

PN7 hipokampus GD bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.83 ± 0.47 , K+LPS grubu için 14.5 ± 1.64 , DYA-YYD grubu için 10.3 ± 0.42 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.16 ± 0.90 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.83 ± 0.40 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS

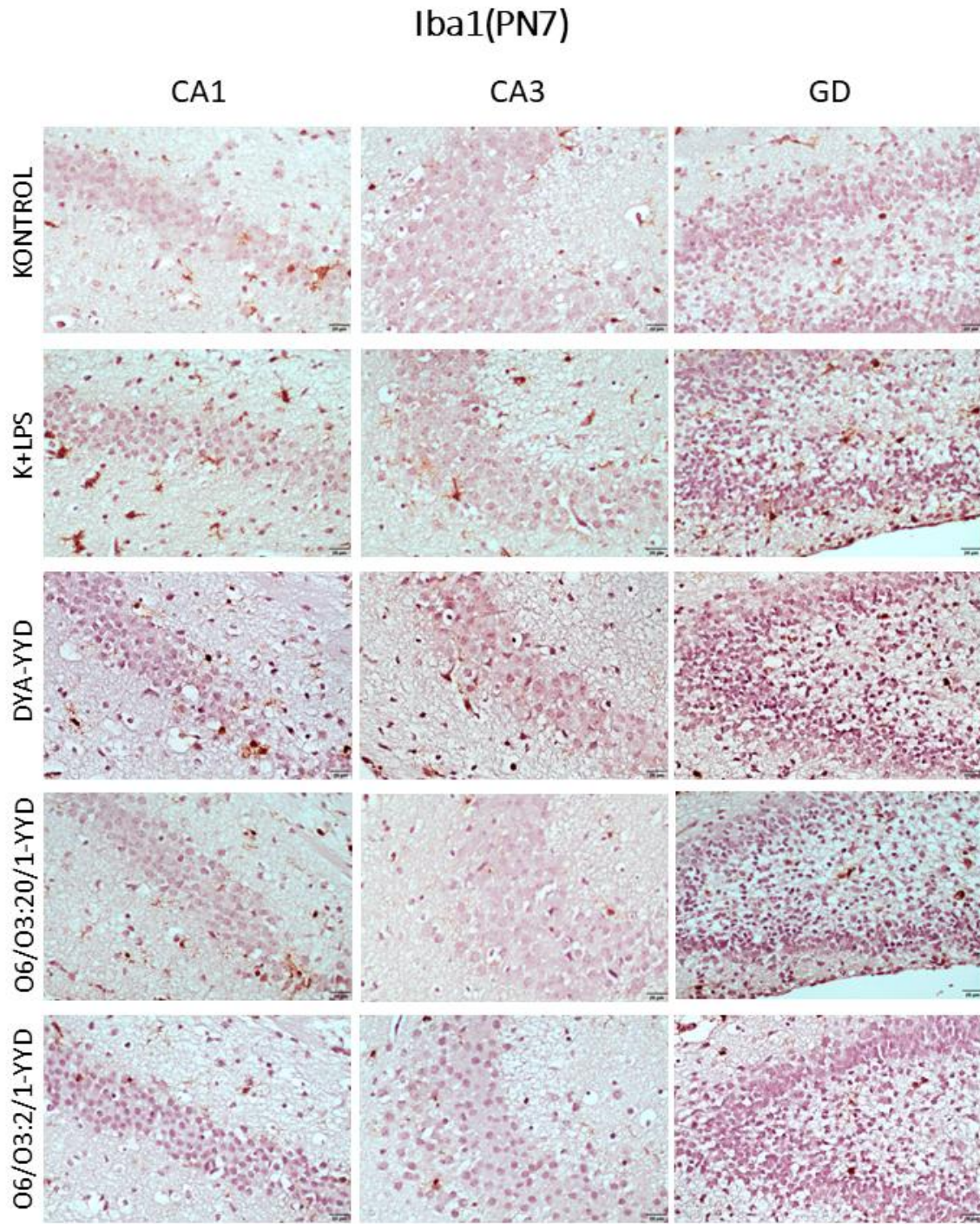
grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.060$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.018$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.009$, $p = 0.004$, $p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.014$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.006$). (Figür 4, Grafik 15)

PN7 hipokampus GD bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 6.67 ± 0.80 , K+LPS grubu için 21.0 ± 1.75 , DYA-YYD grubu için 17.17 ± 0.87 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 6.5 ± 0.96 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.33 ± 0.33 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.935$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.040$). K+LPS ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.052$). K+LPS grubu ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu iki gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.004$, $p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.004$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.004$). (Figür 5, Grafik 16)

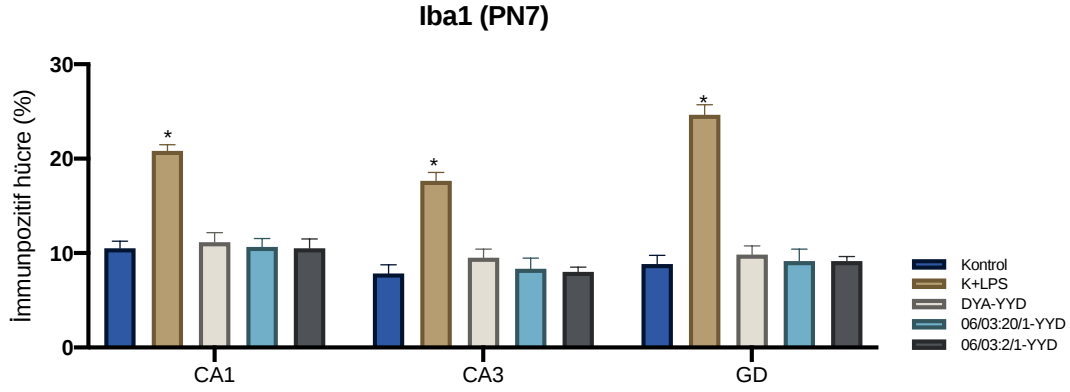
PN7 hipokampus GD bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 8.83 ± 0.95 , K+LPS grubu için 24.67 ± 1.05 , DYA-YYD grubu için 9.83 ± 0.95 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 9.17 ± 1.25 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 9.17 ± 0.48 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.420, p=0.809, p=0.684$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (hepsi için; $p = 0.004$). DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunmadı (sırasıyla ; $p=0.686, p=0.684, p=0.936$). (Figür 6, Grafik 17)



Figür 8: PN7 Hipokampus IL1 β . İmmünpozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.



Figür 9: PN7 Hipokampus Iba1

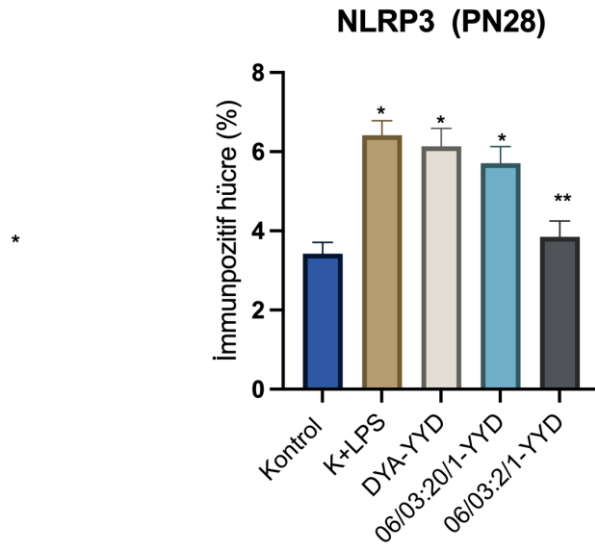


Grafik 17: PN7 Hipokampus Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. *:Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

3.5.2. PN28 Prefrontal Korteks ve Hipokampus İmmünohistokimyasal Sonuçları

PN28 prefrontal korteks immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; tüm antikorlar için ; $p<0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

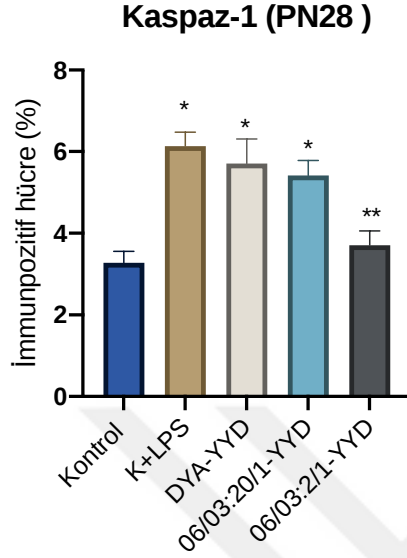
PN28 prefrontal korteks NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.43 ± 0.30 , K+LPS grubu için 6.43 ± 0.37 , DYA-YYD grubu için 6.14 ± 0.46 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 5.71 ± 0.42 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.86 ± 0.40 olarak hesaplandı. Kontrol ile



Grafik 18:PN28 Prefrontal Korteks NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

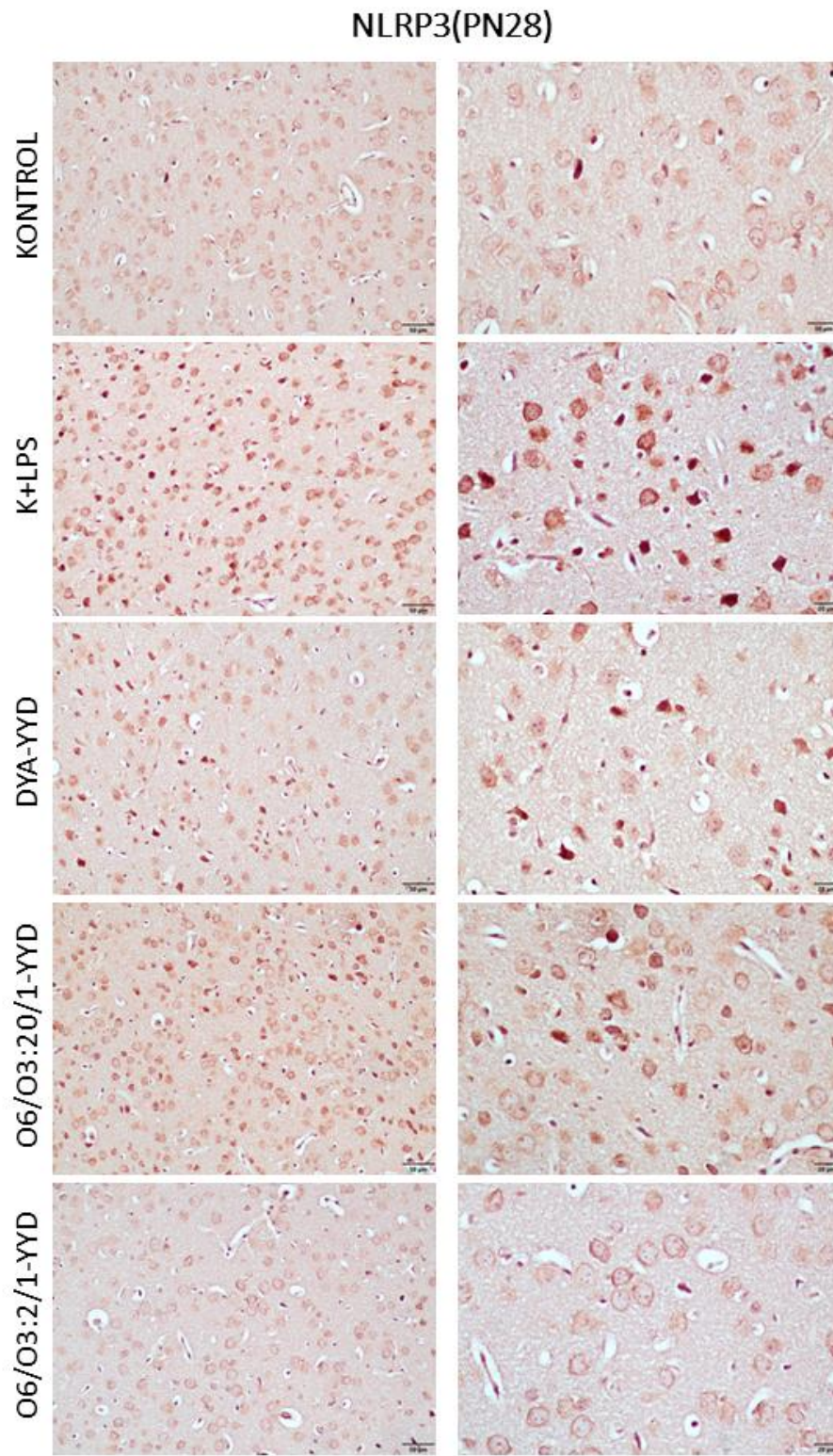
K+LPS, DYA-YYD ,O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı bu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla;p =0.001,p=0.001,p=0.003). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.336). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; her iki grup için de anlamlı bir fark bulunmadı(sırasıyla;p =0.596, p=0.259). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.002).DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.550). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.005). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.013). (Figür 7, Grafik 18)

PN28 prefrontal korteks kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.28 ± 0.28 , K+LPS grubu için 6.14 ± 0.34 , DYA-YYD grubu için 5.71 ± 0.60 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 5.42 ± 0.36 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.71 ± 0.35 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS,DYA-YYD,O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında;kaspaz-1 işaretli hücre sayısı bu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı(sırasıyla;p=0.001,p=0.005,p=0.003). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.893). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; her iki grup için de anlamlı bir fark bulunmadı(sırasıyla;p =0.551, p=0.181). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.002).DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.843). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.019). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı (p =0.008).(Figür 8, Grafik 19)



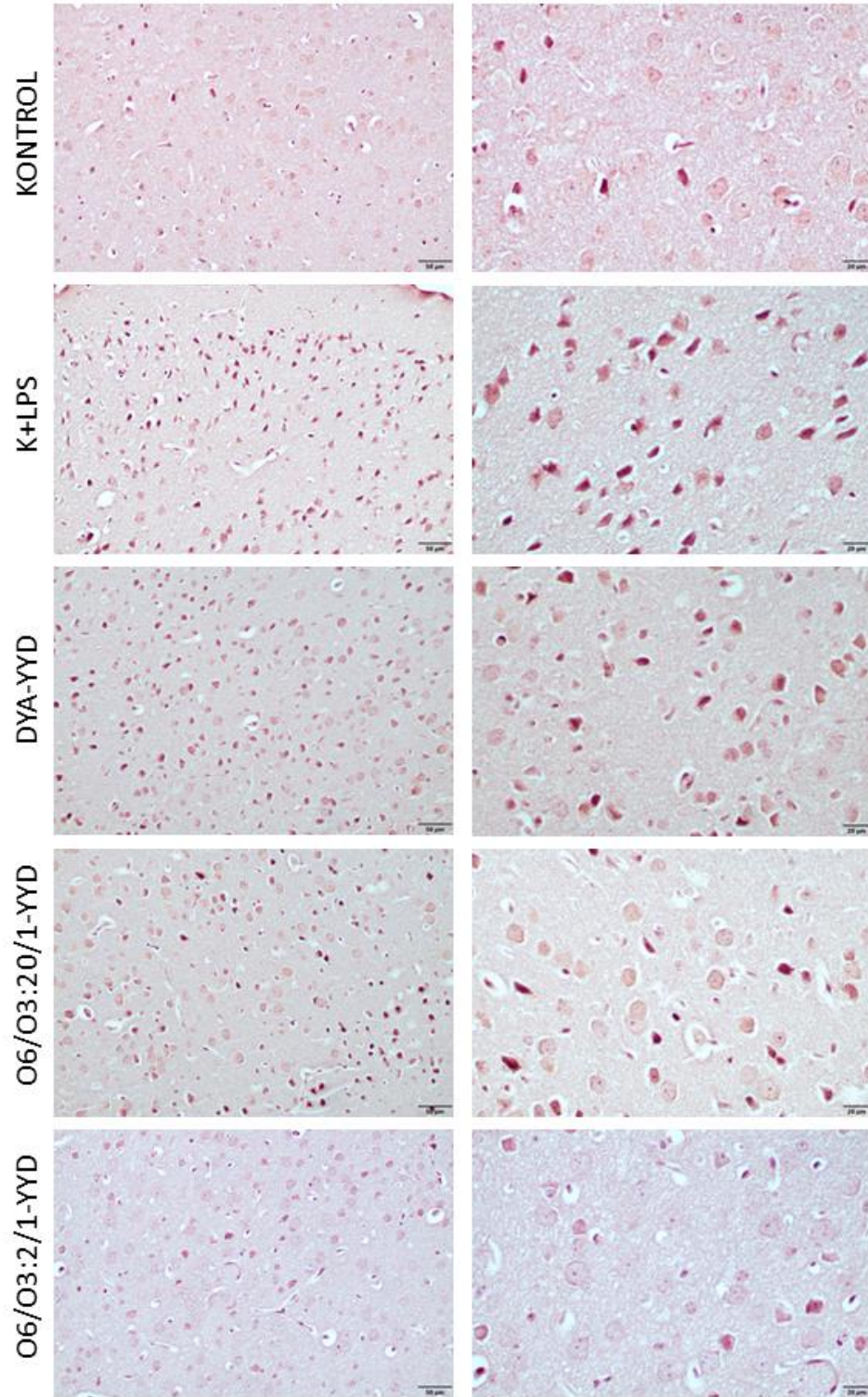
Grafik 19: PN28 Prefrontal Korteks Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN28 prefrontal korteks IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 5.14 ± 0.34 , K+LPS grubu için 8.28 ± 0.47 , DYA-YYD grubu için 8.00 ± 0.30 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.28 ± 0.28 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 5.14 ± 0.55 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS, DYA-YYD ,O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı bu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.001, p = 0.002, p = 0.003$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.299$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; her iki grup için de anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.638, p = 0.140$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.133$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.002$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.007$). (Figür 9, Grafik 20)

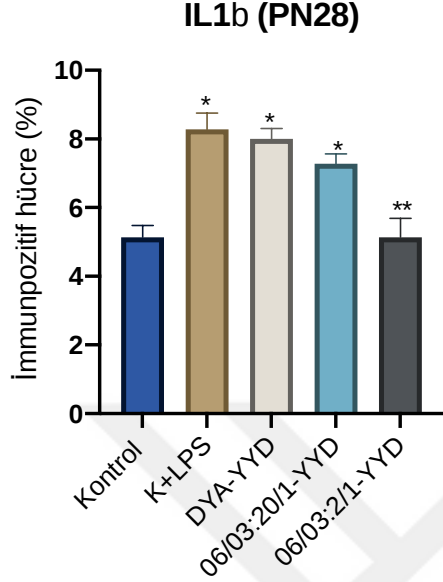


Figür 10 : PN28 Prefrontal Korteks NLRP3

Kaspaz-1(PN28)

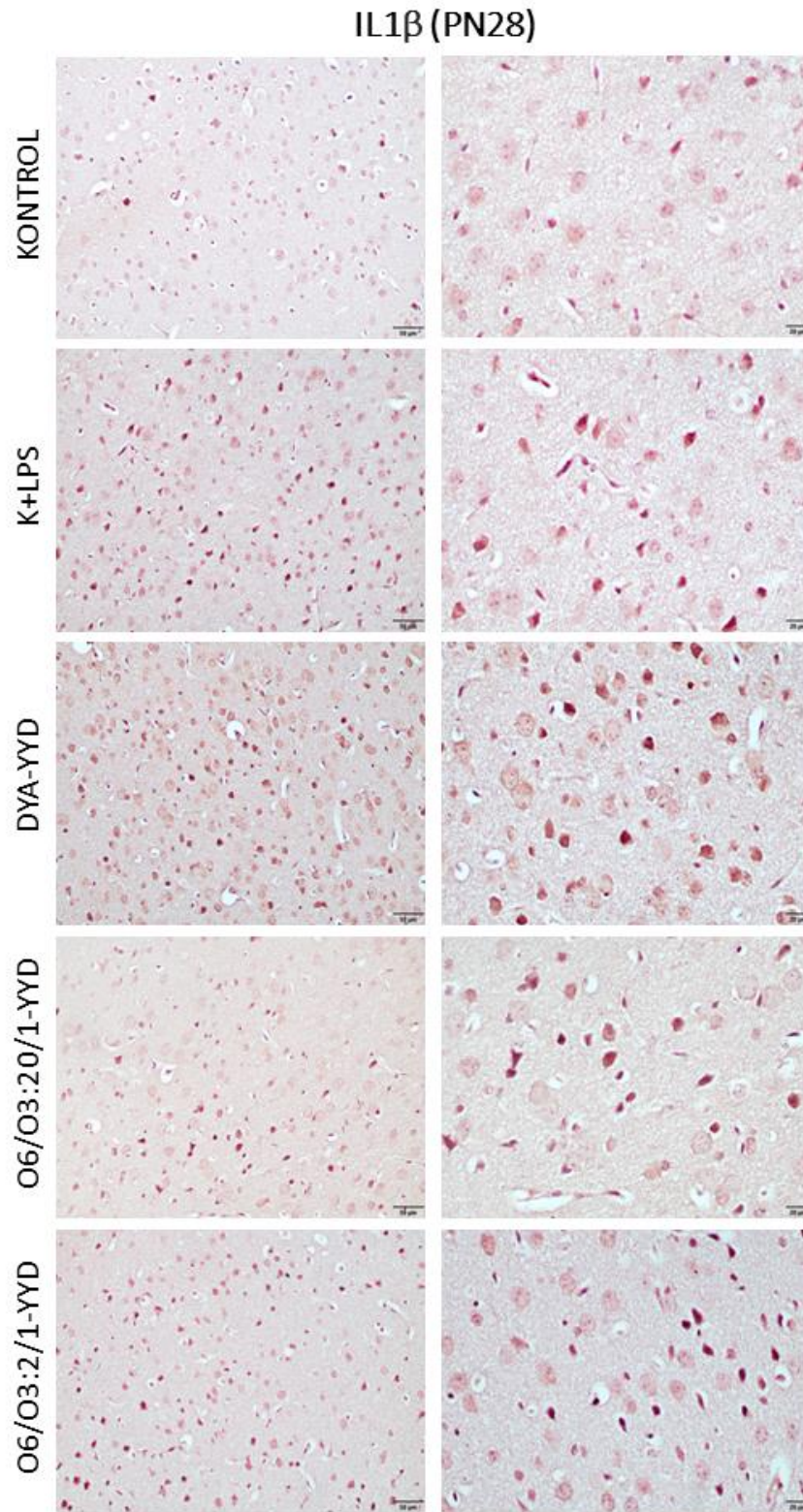


Figür 11: PN28 Prefrontal Korteks Kaspaz-1

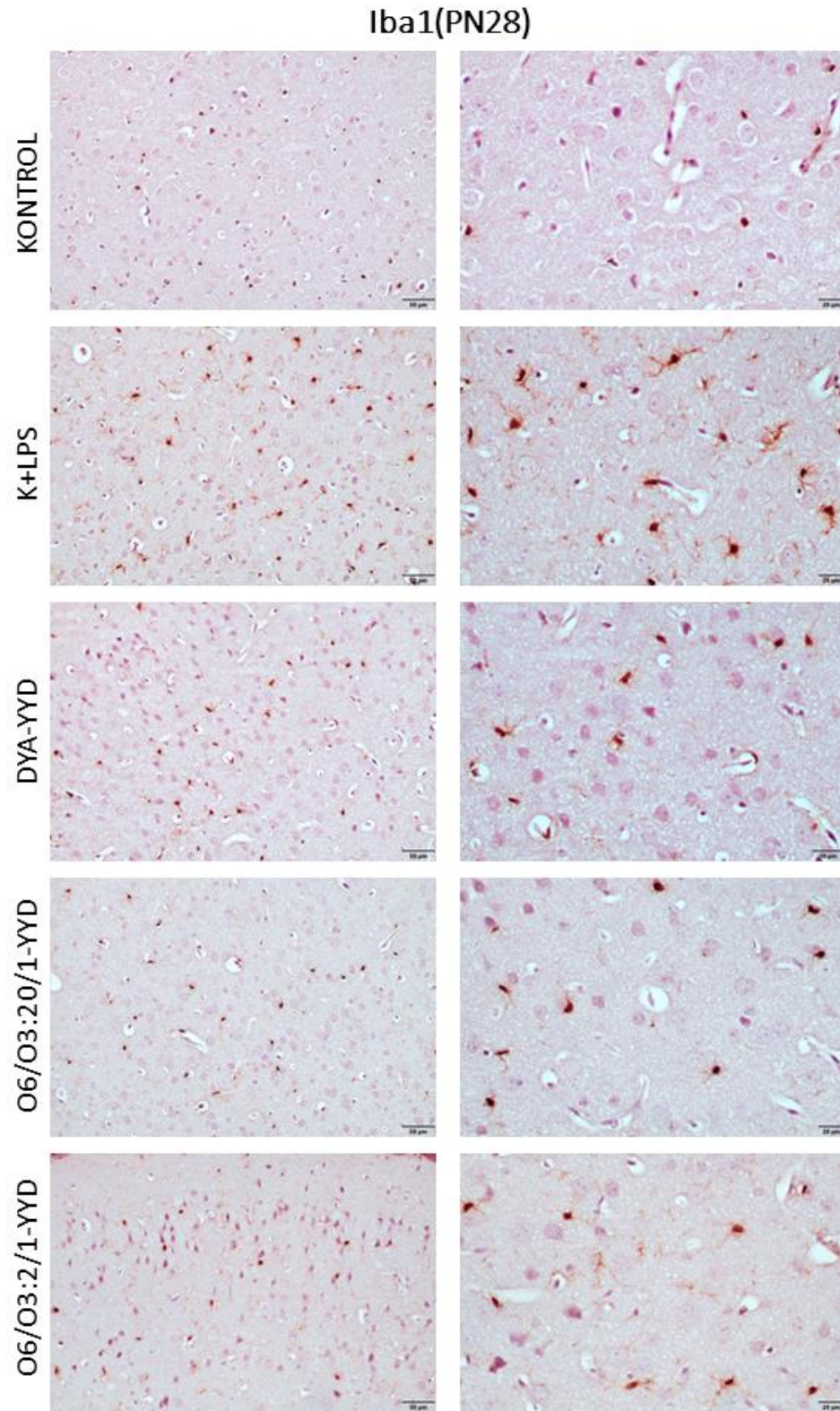


Grafik 20: PN28 Prefrontal Korteks IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ** : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

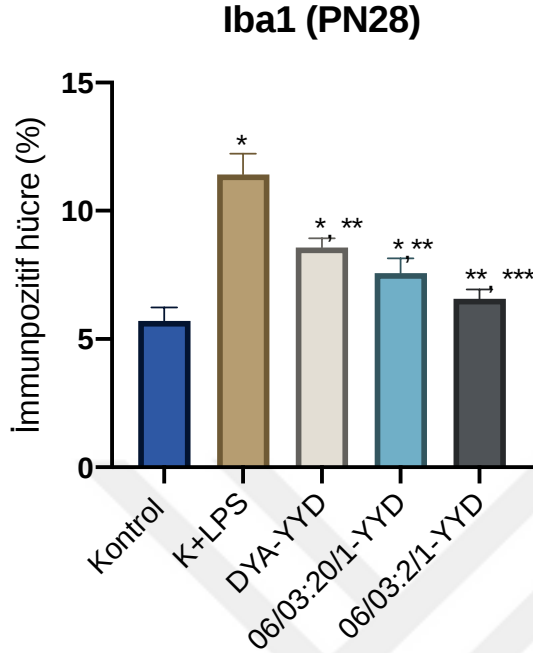
PN28 prefrontal korteks Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 5.71 ± 0.42 , K+LPS grubu için 11.42 ± 0.81 , DYA-YYD grubu için 8.57 ± 0.36 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 7.57 ± 0.57 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 6.57 ± 0.36 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS, DYA-YYD ,O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı bu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.002, p = 0.002, p = 0.031$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.163$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD ,O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.014, p = 0.006, p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.170$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.006$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.234$). (Figür 10, Grafik 21)



Figür 12: PN28 Prefrontal Korteks IL1 β



Figür 13: PN28 Prefrontal Korteks Iba1



Grafik 21: PN28 Prefrontal Korteks Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ***: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN28 hipokampus CA1 bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; tüm antikorlar için ; $p < 0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

PN28 hipokampus CA1 bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.71 ± 0.29 , K+LPS grubu için 5.29 ± 0.52 , DYA-YYD grubu için 5.14 ± 0.26 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.57 ± 0.20 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.43 ± 0.2 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.475$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları

karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı($p=0.836, p=0.294$) . K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.114$).DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.001$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.001$). (Figür 11, Grafik 22)

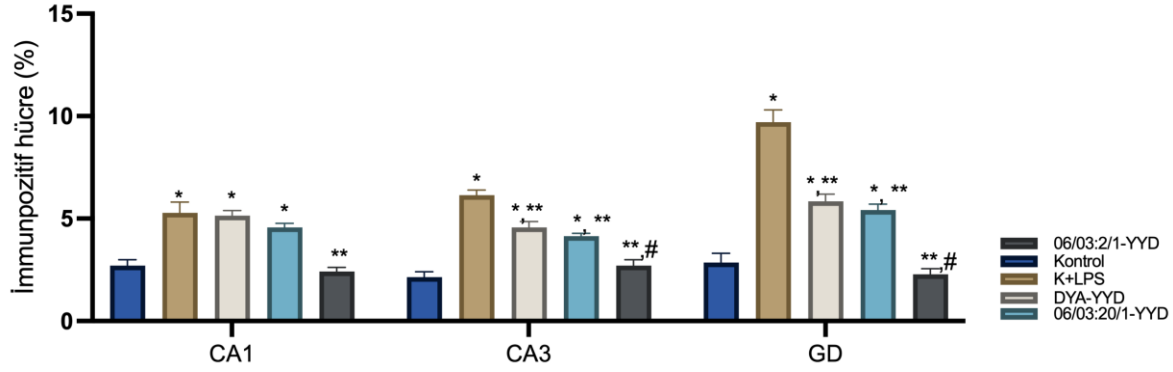
PN28 hipokampus CA1 bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.57 ± 0.37 , K+LPS grubu için 5.00 ± 0.62 , DYA-YYD grubu için 5.00 ± 0.31 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.43 ± 0.30 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.29 ± 0.29 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p =0.006$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p =0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p =0.006$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.539$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı($p=0.740, p=0.590$) . K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.003$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.240$).DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.001$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.001$). (Figür 12, Grafik 23)

PN28 hipokampus CA1 bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.43 ± 0.37 , K+LPS grubu için 5.71 ± 0.57 , DYA-YYD grubu için 5.29 ± 0.68 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.86 ± 0.40 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.43 ± 0.20 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p =0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p =0.005$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı

($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.944$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0.602, p = 0.294$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.744$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.003$). (Figür 13, Grafik 24)

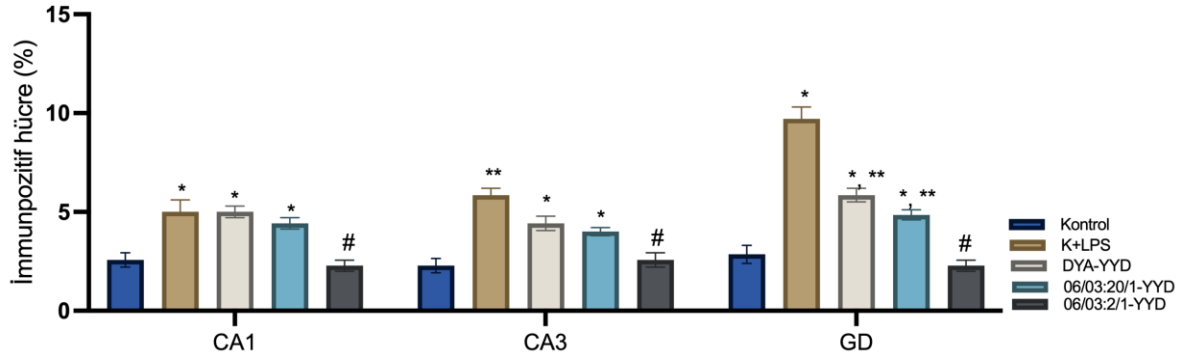
PN28 hipokampus CA1 bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 4.71 ± 0.61 , K+LPS grubu için 11.86 ± 0.51 , DYA-YYD grubu için 7.29 ± 0.52 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 5.14 ± 0.59 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.00 ± 0.31 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.013$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p = 0.599, p = 0.417$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (hepsi için; $p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı ile O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.024$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı ile O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.005$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı ile O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.017$). (Figür 14, Grafik 25)

NLRP3 (PN28)

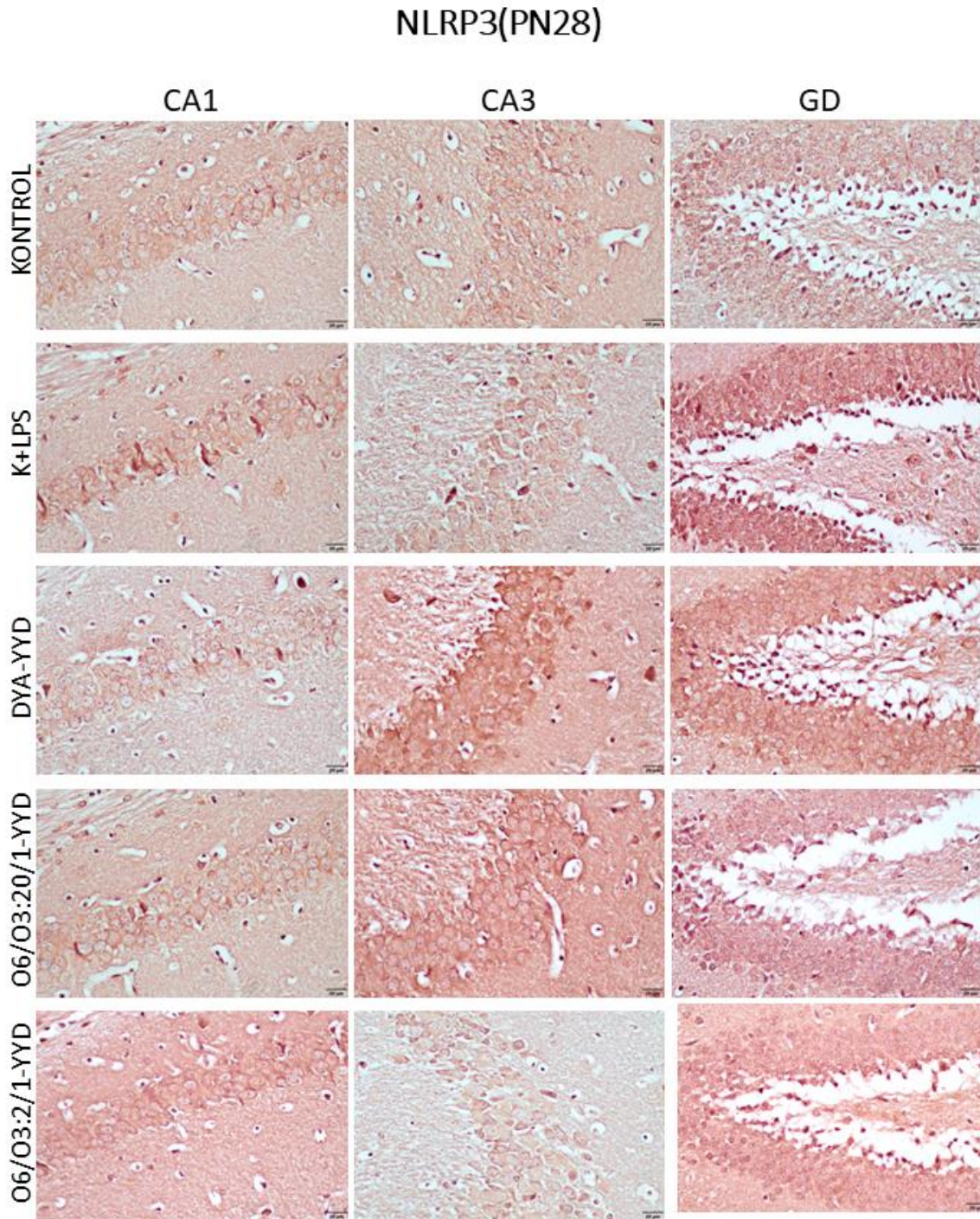


Grafik 22: PN28 Hipokampus NLRP3 İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DY-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık . CA3 için; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DY-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.

Kaspaz-1 (PN28)



Grafik 23: PN28 Hipokampus Kaspaz-1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, # : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DY-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık . GD için; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ** : K+LPS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, # : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık.



Figür 14: PN28 Hipokampus NLRP3

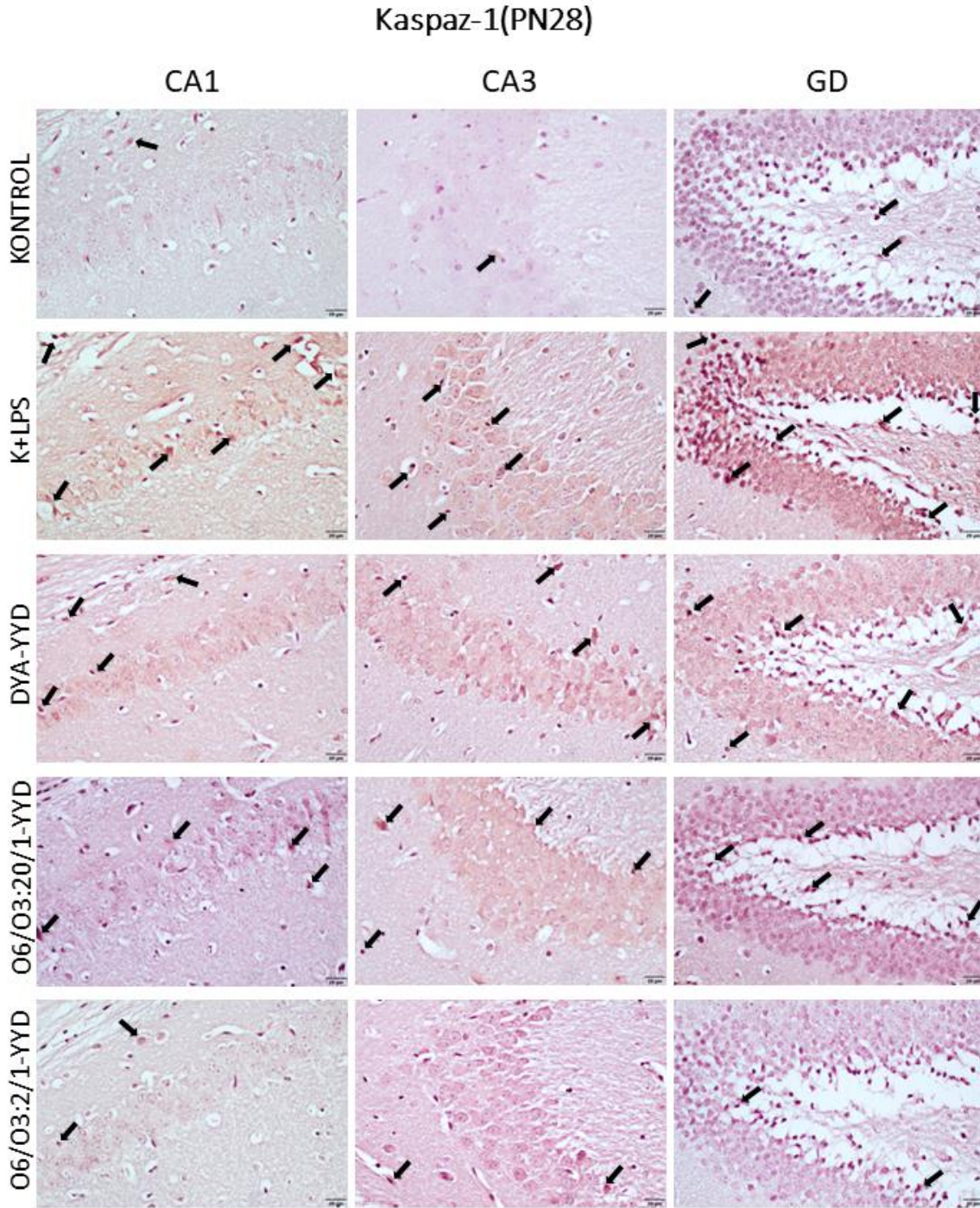
PN28 hipokampus CA3 bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayımlarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; tüm antikorlar için ; $p<0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

PN28 hipokampus CA3 bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.14 ± 0.26 , K+LPS grubu için 6.14 ± 0.26 , DYA-YYD grubu için 4.57 ± 0.30 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.14 ± 0.14 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.71 ± 0.29 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.184$). K+LPS ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.006$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.227$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.003$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.003$). (Figür 11, Grafik 22)

PN28 hipokampus CA3 bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.29 ± 0.36 , K+LPS grubu için 5.86 ± 0.34 , DYA-YYD grubu için 4.43 ± 0.37 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.00 ± 0.22 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.57 ± 0.37 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.005$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.006$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar

arasında anlamlı bir fark bulunmadı($p=0.500$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p =0.021$, $p=0.002$, $p=0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p =0.354$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.002$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.009$). (Figür 12, Grafik 23)

PN28 hipokampus CA3 bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.86 ± 0.51 , K+LPS grubu için 6.00 ± 0.44 , DYA-YYD grubu için 4.14 ± 0.40 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.00 ± 0.22 ,O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.86 ± 0.33 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.003$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı($p =0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı(sırasıyla; $p=0.071$, $p=0.947$).K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p=0.049$, $p=0.002$, $p =0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.320$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p =0.015$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı($p=0.023$). (Figür 13, Grafik 24)



Figür 15: PN28 Hipokampus Kaspaz-1. İmmünopozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.

PN28 hipokampus CA3 bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.14 ± 0.40 , K+LPS grubu için 12.43 ± 1.36 , DYA-YYD grubu için 5.14 ± 0.46 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.43 ± 0.37 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 3.00 ± 0.31 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.005$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.022$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.892$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (hepsi için; $p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.114$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.005$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında ; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.022$). (Figür 14, Grafik 25)

PN28 hipokampus GD bölgesi immünohistokimyasal olarak işaretli hücre sayılarına bakıldığında 5 grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (Kruskal -Wallis ; tüm antikorlar için ; $p < 0.001$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile ikili gruplar arasında değerlendirildi.

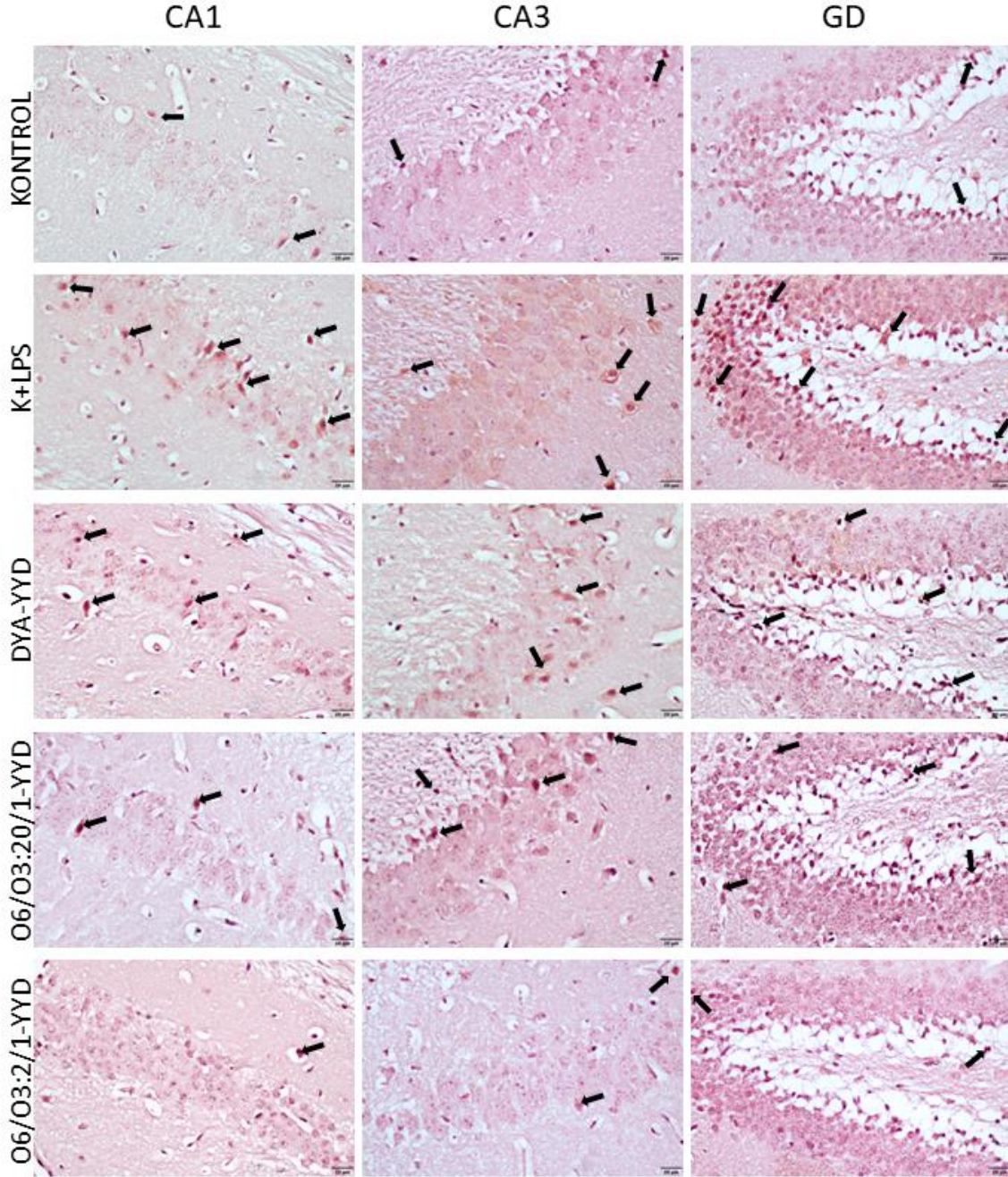
PN28 hipokampus GD bölgesi NLRP3 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.86 ± 0.46 , K+LPS grubu için 9.71 ± 0.61 , DYA-YYD grubu için 5.86 ± 0.34 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 5.43 ± 0.30 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.29 ± 0.29 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.001$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.319$). K+LPS ile DYA-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.002$). K+LPS ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.001$). K+LPS ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak

azalmıştı ($p = 0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.317$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.001$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; NLRP3 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.001$). (Figür 11, Grafik 22)

PN28 hipokampus GD bölgesi kaspaz-1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 2.86 ± 0.46 , K+LPS grubu için 9.71 ± 0.61 , DYA-YYD grubu için 5.86 ± 0.34 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.86 ± 0.26 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.29 ± 0.29 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.319$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.002$, $p=0.001$, $p=0.002$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.046$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.001$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında kaspaz-1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.001$). (Figür 12, Grafik 23)

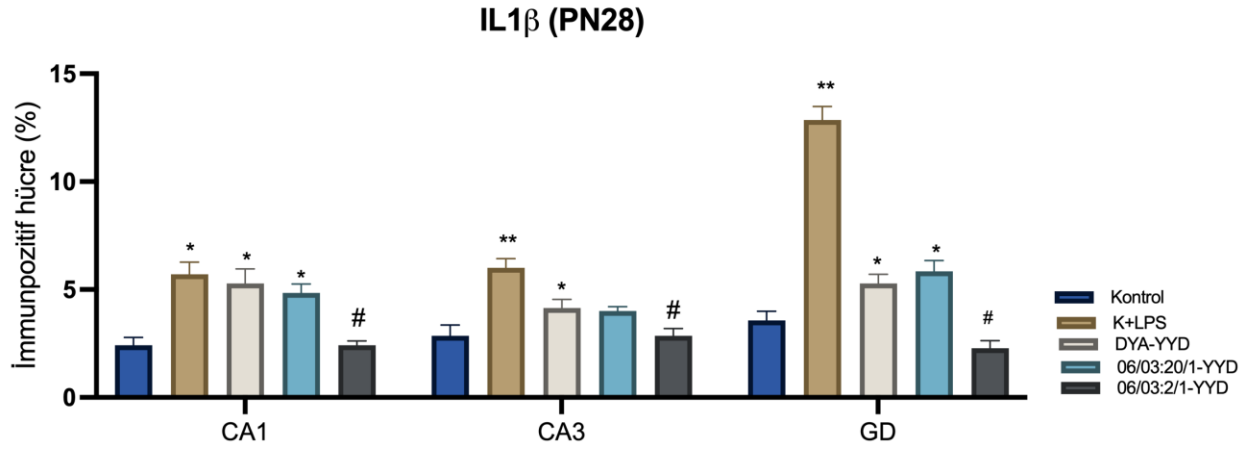
PN28 hipokampus GD bölgesi IL1 β immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 3.57 ± 0.43 , K+LPS grubu için 12.86 ± 0.63 , DYA-YYD grubu için 5.29 ± 0.42 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 5.86 ± 0.51 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 2.29 ± 0.36 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p=0.001$). Kontrol ile DYA-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı DYA-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.007$). Kontrol ile O6/O3:20/1-YYD grubu karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.004$). Kontrol ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.610$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; IL1 β işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak

IL1 β (PN28)

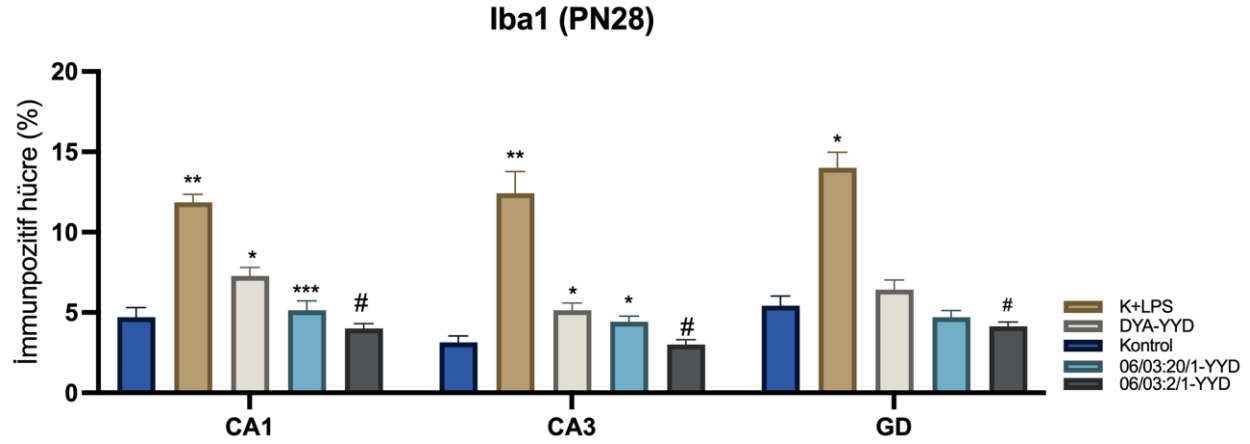


Figür 16: PN28 Hipokampus IL1 β . İmmünopozitif hücreler ok ile işaretlenmiştir.

artmıştı (sırasıyla; $p = 0.002$, $p = 0.002$, $p = 0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:20/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.430$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.002$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında ; IL1 β işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.002$). (Figür 13, Grafik 24)



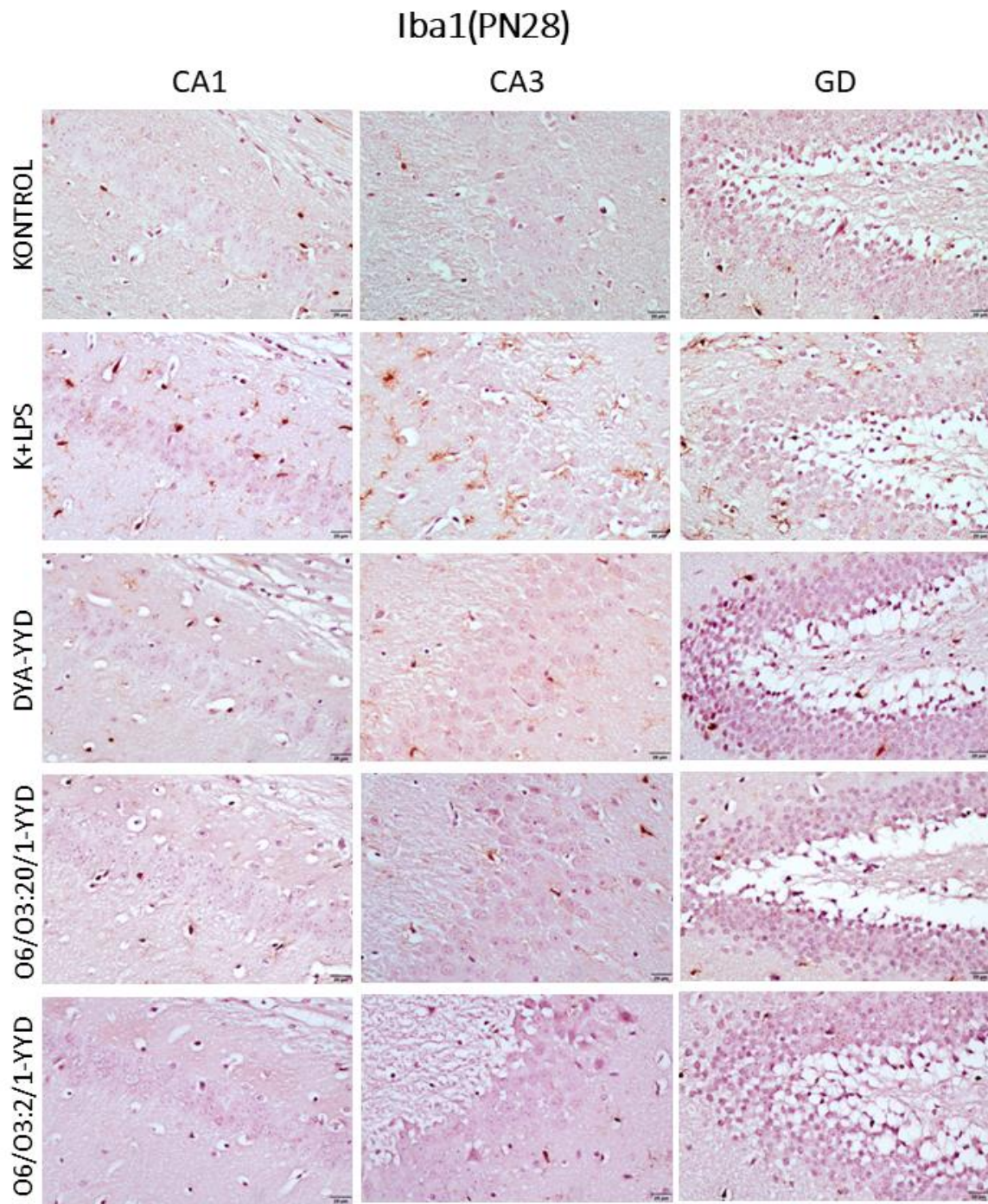
Grafik 24: PN28 Hipokampus IL1 β İmmünohistokimyasal Sonuçları . CA1 için ; * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, # : K+LPS,DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. CA3 için; *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık . GD için; *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, ** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık , #:DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık



Grafik 25: PN28 Hipokampus Iba1 İmmünohistokimyasal Sonuçları. CA1 için ; *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,***: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık. GD için ; ,* : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

CA3 için; *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık,** : Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, #: DYA-YYD grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık

PN28 hipokampus GD bölgesi Iba1 immünohistokimyasal değerlendirmesi; Kontrol grubu için 5.43 ± 0.61 , K+LPS grubu için 14.00 ± 0.98 , DYA-YYD grubu için 6.43 ± 0.61 , O6/O3:20/1-YYD grubu için 4.71 ± 0.42 , O6/O3:2/1-YYD grubu için 4.14 ± 0.26 olarak hesaplandı. Kontrol ile K+LPS grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda anlamlı olarak artmıştı ($p = 0.002$). Kontrol ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $p=0.216, p=0.468, p=0.115$). K+LPS ile DYA-YYD, O6/O3:20/1-YYD, O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında; Iba1 işaretli hücre sayısı K+LPS grubunda bu üç gruba göre anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla; $p = 0.002, p=0.002, p=0.001$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.057$). DYA-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grubu ; Iba1 işaretli hücre sayısı O6/O3:2/1-YYD grubunda anlamlı olarak azalmıştı ($p = 0.004$). O6/O3:20/1-YYD ile O6/O3:2/1-YYD grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.280$). (Figür 14, Grafik 25)



Figür 17: PN28 Hipokampus Iba1

4. TARTIŞMA

Dünyada hızla gelişen sanayileşme ve kentleşme, zaman kısıtı nedeniyle hızlı yeme alışkanlığı, fiziksel aktivitede azalma gibi insanların yaşam tarzındaki değişimler yüksek oranda yağ ve şeker içeren hazır gıda tüketimine itmektedir. Bu yaşam tarzında karşımıza çıkabilecek metabolik problemler gebelik döneminde de hem maternal hem de fetal etkiler göstermektedir. Gebelik döneminde alınan besinler, gelişmekte olan fetüs için tek besin kaynağı olup, doğum öncesi büyüme ve gelişmenin kritik belirleyicisidir. Gebelik döneminde mikrobeseinlerin ya da toplam enerji alımındaki eksikliklerin sonucunda yenidoğanda yetersiz büyüme ve uzun vadeli sağlık sorunları görülmektedir[53].

Maternal beslenmenin nörogelişimsel gelişim etkileri son dönemde üzerinde çalışılan konulardandır[54]. Gebelikte maternal makro besin ve mikro besin alımının fetal beyin gelişimi ve yavru davranışı üzerindeki etkisine odaklanan çalışmalar olmasına rağmen [54], [55] maternal diyetin yavrular üzerindeki nörolojik etkileri tam olarak açığa kavuşmamıştır [56]. Bizim çalışmamızın amacı da gebelik ve emzirme döneminde doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet, Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle beslenmenin, yenidoğan beyinde NLRP3 inflamazom aktivitesine etkilerini incelemektir.

Organizmaların maruz kaldığı ilk ortam intrauterin ortamdır. Gebelikte ve laktasyon döneminde annenin beslenmesi, çocuğun fetal ve postnatal gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir ve tüm yaşamı boyunca metabolik hastalıklara karşı duyarlılığını değiştiren bir faktördür [36]. Maternal beslenmenin, fetal ve postnatal gelişimde metabolik işlevlerin yanı sıra organların anatomik ve fonksiyonel işlevleri üzerine etki etmesindeki en önemli mekanizmalardan biri inflamasyondur. İnflamatuar faktörler, kan plasenta bariyerini geçerek fetal beyin gelişimini etkilemektedir. Örneğin, hem kemirgenlerde hem de primatlarda yapılan deneylerde uzun süreli yüksek yağlı anne beslenmesinin yavrularda inflamatuvar belirteçlerin yükselmesine neden olduğunu gösterilmiştir[27].

Annenin gebelik öncesi ve sonrası diyetinin fetüsün immünolojik gelişimi üzerinde etkisi metabolik durumu değiştirerek veya sitokinler gibi dolaşımdaki immün aktif moleküllerin seviyelerini değiştirerek olabilir. Bazı diyet bileşenleri ayrıca inflamasyon sürecini düzenleyen ve

maternal/fetal inflamatuvar yanıtları modüle eden belirli transkripsiyon faktörleriyle de etkileşime girebilir [57].

NLRP3 inflamazom aktivasyonu, çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenebilen ve merkezi sinir sisteminde inflamatuvar tepkileri harekete geçiren bir multiprotein kompleksidir[58]. Son çalışmalar, mikrogial hücrelerdeki NLRP3 inflamazom yanıtının, yetişkinlerde substrat mevcudiyeti ve beyin enerjisi metabolizması yoluyla modüle edilebileceğini göstermektedir[59]. Maternal yüksek yağlı beslenmenin çeşitli etkileri bilinmesine rağmen [60] Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle zengin beslenmenin yavrulardaki inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkileri belirlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda maternal yüksek yağlı diyetin yenidoğanlarda obezite, metabolik sendrom gibi uzun vadeli bozuklukları tetikleyebileceği gösterilmiştir [36]. Kemirgenlerde hamilelik sırasında yüksek yağ tüketimi yavruların hipokampüsünde proinflamatuvar sitokinlerin artmasına ve mikroglia aktivasyonuna neden olmuştur. Farelerde yapılan deneyde maternal yüksek yağlı diyetle maruz kalan yavruların hipokampüsünde NOTCH sinyal yolu aracılığıyla nörogenezin engellendiği ve hipotalamik hücre proliferasyonunun azaldığı bildirilmiştir[36]. Benzer şekilde; maternal yüksek yağlı ve yüksek şekerli diyetin mikrogial aktivasyonu indüklediği, nörogenezini bozduğu ve yavrularda kaygıyı artırdığı gösterilmiştir[61]. Bizim çalışmamızda da nöronal gelişim açısından değerlendirildiğinde 7. günde prefrontal korteksteki nöron sayıları annelerin diyetinden etkilenmemiştir, ancak CA1, CA3 ve GD bölgelerinde doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubunun nöron sayıları Kontrol, Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle göre azalmıştı. 28 günde ise hem prefrontal bölgede hem de hipokampüste doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet sonucunda Kontrol, Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle göre nöron sayılarında azalma gözlemlendi. İnflamazom aktivasyona ilişkin bir çalışmada maternal yüksek yağlı diyetle beslenen annelerden doğan yavrular doğum sonrası yüksek yağlı diyetle beslenmeye 16. haftaya kadar devam ettirilmiş ve bu yavrularda epididimal yağ dokuda inflamazom aktivasyonuna bağlı olarak insülin rezistansının arttığı gösterilmiştir[39]. Bizim çalışmamızda da ilk olarak beynin farklı bölgelerinde hem 7. günde hem 28. günde doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyetin Kontrol gruplarına göre inflamazom aktivasyonunda artış gösterdiği belirlendi.

Omega-3 ve Omega-6 yağ asitleri, vücutta sentezlenemediği için vücuda dışarıdan alınması zorunlu olan yağ asitleridir. Omega-3 yağ asidi takviyesi, oksidatif stresin neden olduğu zararlı

etkilere karşı savunma mekanizması geliştirme potansiyeline de sahiptir[62]. Gebelikte yüksek oksidatif stres düzeyleri plasental yaşlanma[63], intrauterin gelişme geriliği[64], erken doğum[65], preeklampsi[66] dahil maternal ve fetal artmış mortalite ve morbidite riski ile ilişkilendirilmiştir[67]. Literatürde oksidatif stresin gebelik üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmada Omega-3 kullanımına yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmektedir.

Gebeliğin son trimesterinde maternal DHA seviyesinin düşme eğiliminde olduğu[68] ve fetüsün özellikle beyinde yaklaşık günde 70 mg'a kadar DHA biriktiği bilinmektedir[69]. Üçüncü trimesterde maternal plazmada uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin plasental taşınması, fetal/postnatal beyin gelişiminde ve retina gelişimi için kritik öneme sahiptir[70]. İnsan çalışmalarıyla son trimesterde ve postnatal ilk 18 ay içinde DHA'nın hızla beyinde biriktiği bulunmuştur. Bu dönemdeki omega 3 ve omega 6 poliansature yağ asitlerinin ana kaynağı; bu maddeleri plasenta ve emzirme yoluyla yavruya aktaran anne kaynaklıdır [32].

Gebelik sırasında yüksek yağlı diyet ile beslenme erken doğum riskinde azalma ve düşük doğum ağırlık riski ile ilişkilendirilmiştir. Middleton ve arkadaşlarının [71] yaptığı cochrane sistematik derlemesinde, Omega-3 kullanımı sonrasında gebelik süresinin uzadığı, perinatal ölüm ve yenidoğan yoğun bakıma yatışlarında azalma olduğu, düşük doğum ağırlıklı bebek riskinde düşüş saptandığı ve intrauterin büyüme geriliğinin saptanmadığı bildirilmiştir[71]. Lepinay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Omega6/Omega3 oranının yüksek olduğu yağlı diyet ile beslenen yavruların doğum ağırlıkları (P0. Gün) Kontrol grubuna göre düşüktü[72]. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde doğum ağırlıkları açısından incelediğimizde 0. günde yavru ağırlıkları doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet, Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi. 7. günde Kontrol grubuna göre artış gösterdikleri belirlendi. 7. güne ait beyin ağırlıkları karşılaştırıldığında ise sadece Omega 3'ten zengin olan yüksek yağlı diyet ile beslenen grupta diğer gruplara göre anlamlı artış gözlemlendi. Emzirme dönemini içeren 28. günde ise hem doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet hem de Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında yavru ağırlıkları Kontrol grubuna göre artış göstermişti ancak sadece Omega 3'ten zengin diyet grubu anlamlı olarak yüksekti ve literatür ile benzer özellikteydi[72]. 28. gün beyin ağırlıklarında ise gruplar arasında fark gözlenmedi.

Postpartum dönemde omega-3 kullanımı ile ilgili veriler sınırlı olmakla birlikte[73]; çalışmalar daha çok postpartum depresyon ve anne sütü içeriği üzerine yoğunlaşmıştır. Anne sütü çeşitli Omega-3 yağ asitlerinden oluşur. Bunlar; alfa linolenik asit (ALA) eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) en yaygın yağ asitleridir. Anne sütündeki omega-3 oranının, bebeğin nörodavranışsal fonksiyonları ve görsel gelişimi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır[74]. Emzirme döneminde Omega-3 alımının yaşamın ilk iki yılında beyin gelişimi için de önemli olduğu bildirilmiştir[73]. Omega-3 kadar Omega-6 yağ asitleri de nöronal hücreler de dahil olmak üzere genel insan membran hücrelerinin ana bileşenleridir[75]. Önceki çalışmalar, Omega-3 takviyesinin nörogenezde artış ile ilişkili olduğunu bildirmiştir[76]. Diğer bazı mekanizmalar, nöronal membranın akışkanlığı, reseptörlerin afinitesi, sinyal moleküllerinin öncüsü, enzim aktivitesi, iyon kanalı geçirgenliği ve nörotransmitterin modifikasyonları yoluyla her iki yağ asidinin beyin fonksiyonu üzerindeki etkisinin altını çizebilir[77]. Omega-3'ün bipolar semptomları azaltmada etkili olabileceğini de düşünülmektedir[78]. Aksine perinatal aşırı Omega-6 maruziyetinin yavrularda aşırı yağlanma ve obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [31]. Bizim çalışmamızda nöronal yoğunluk incelendiğinde 7. günde prefrontal korteksteki nöron sayıları doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubu kontrol grubuna yakın iken, Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında kontrole ve doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubuna göre prefrontal kortekste nöron sayılarına artış gözlemlendi. Bu artışın nedeni Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında anneye verilen Omega-3 içeriğinin diğer gruplara kıyasla nöron gelişimini olumlu etkilemesinden kaynaklandığı düşünüldü. Bir kısıtlılık olarak Kontrol+Omega 3 grubumuzun olmaması yüksek yağlı diyetin ve Omega-6 oranının yüksek olduğu grubun Kontrole kıyasla doğru değerlendirilmemesine neden olmuş olabilir. 7. günde hipokampusün CA1, CA3 ve GD bölgesinde nöron sayıları Kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte, doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubuna göre Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında artış olduğu gözlemlendi. 28 günde ise prefrontal kortekste Omega3 yüksek olan grupta tüm gruplara göre nöron sayısında anlamlı olarak artış gözlemlendi. 28. günde de hipokampusün CA1, CA3 ve GD bölgesinde Kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte, doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubuna göre Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında artış olduğu gözlemlendi.

Poliansature yağ asitlerinden ikisi olan Omega-3 ve Omega-6 yağ asitleri insan beslenmesinde çok önemli role sahiptir. Bununla birlikte hangisinin ne kadar kullanılacağı konusunda hala belirsizlikler vardır. Hayvan çalışmaları beslenmede aşırı eksiklikler, besin etkileşimleri ve aşırı alımlar dahil olmak üzere bir dizi diyet koşulunu mimik edebilmektedir. Bu nedenle, hayvan araştırmaları hala beslenmedeki rolleri hakkındaki bilgimizi geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Omega-3 ve Omega-6'nın zıt etkisi, bilişsel gelişim üzerinde tutarsız sonuçlar sergileyebilir. Her iki yağ asidinin diyetle alımı, hücre zarına dahil olmak için birbirleriyle rekabet edebilir.

Yapılan bir çalışmada omega-6 (n-6) çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ve düşük omega-3 (n-3) PUFA'ları (n-6yüksek/n-3düşük) içeren bir diyet tüketen hamile farelerin n-6/n-3 oranı yaklaşık 120 olan diyetle, orta beyin dopaminerjik sistemini yukarı regüle ederek yavrularda hedonik (haz veren) tüketime neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada n-6yüksek/n-3düşük diyetle maruz kalmanın, artan mezolimbik dopamin salınımı yoluyla özellikle lezzetli gıdaların tüketimini arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, nörogelişimsel analizler, n-6yüksek/n-3düşük diyetine in utero dopaminerjik nörogenezi arttırdığı, bu uyarılmış hedonik tüketimin embriyogenez sırasında programlandığını ortaya koymuşlardır. Bu bulgular maternal n-6yüksek/n-3düşük PUFA tüketiminin, yavruların oldukça lezzetli yiyecekleri tüketme modeli üzerinde uzun süreli etkileri olabileceğini ortaya koymuştur[79]. Sakayori arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada n-6yüksek/n-3düşük diyetin embriyonik sıçanlara rostral neokorteks kalınlığını azalttığını bulmuşlardır [80]. Yavin ve ark.ları maternal omega6/omega3 oranının daha düşük olduğu diyet grubunda Omega-3 yüksek olan gruba göre postnatal 7. günde korteks ve hipokampüste nöronal migrasyonu geciktirdiğini göstermişlerdir[81]. Nöronal hücre göçünün geçici olarak engellenmesi, nöron gruplarının organizasyonu, nöronlar arasındaki bağlantı (yanal bağlantılar) ve yetişkin beyninde fonksiyon kazanımı üzerinde uzun süreli sonuçlara sahip olabileceği düşünülmüştür[81].

Yapılan başka bir çalışmada sadece gebelikteki yüksek yağlı diyetin yavrudaki nörogenezini etkilemediği ancak hem gebelikte hem de emzirme döneminde devam eden maternal yüksek yağlı diyetle maruz kalmanın yavrunun hipokampüsünde nöron sayılarını düşürerek nörogenezi bozduğu gösterilmiştir[72]. Buradan hareketle bizim çalışmamızda da 7. günde prefrontal korteks ve hipokampüste nöron sayılarındaki düşüşün 28. gündeki kadar bariz olmaması bu alanda daha çok çalışma yapılma gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yalnızca

gebelikteki yüksek yağlı diyetin yavrunun erken dönemdeki beyin gelişimine dair verilere ihtiyaç vardır.

İnflamasyon açısından bakıldığında omega6/omega 3 oranının değiştiği farklı diyetlerde neonatal beyin üzerinde çalışma bulunmamaktadır. Maternal yüksek yağlı diyet tüketiminin, yavru beyin gelişimini, hafıza ve öğrenme zarar verebilecek sistemik bir inflamatuvar durumu teşvik edebileceğine dair çalışmalarda maternal yüksek yağlı diyetle beslenen yavruların 28. gününde hipokampuslerinde proinflamatuvar aktivasyonu gösteren pJNK/JNK oranının yükseldiğini göstermişlerdir[60]. Bizim çalışmamızda; prefrontal kortekste 28. günde IL1 β ve Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri Kontrol grubuna göre doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubu ve Omega-6 oranının yüksek olduğu yüksek yağlı diyet grubunda anlamlı olarak artmıştı ve inflamasyonu desteklemekteydi. Omega-3 oranının yüksek olduğu yüksek yağlı diyet grubunda ise tüm değerlerde pozitif hücre sayısında azalma gözlemlendi.

Mikroglia hücreleri merkezi sinir sistemindeki nöroinflamatuvar yanıtları tetikleme ve koordine etmede kilit oyuncular olan yerleşik makrofajlardır. Sürekli olarak dış ortamdan sinyaller alan ve beslenme immünomodülatörlerine yanıt verebilen hücreleridir[82] Mikrogliaların, farklı fenotiplere geçiş yapabildikleri, merkezi sinir sisteminde farklı tepkiler verebildikleri; diyet bileşenleri tarafından da modüle edilebilirlikleri gösterilmiştir[83]. Sinaps oluşturma veya budama yoluyla gelişim sırasında nöronal devrelerin dinamik olarak şekillendirilmesine de katkı sağlarlar. Fetal mikroglia işlevinde kalıcı değişiklikler, dış etkenlerin bir sonucu olarak mümkündür; örneğin, son zamanlarda, maternal immün aktivasyonun, daha sonra geç adolesan yavrularında sürekli davranış farklılıklarına eşlik eden fetal mikroglial motiliteyi değiştirdiği gösterilmiştir[84]. Annenin gebelik öncesi ve sonrası diyetinin fetüsün immünolojik gelişimi üzerinde etkisi olduğu genel olarak bilinmektedir. Bu etki, metabolik durumu değiştirerek veya sitokinler gibi dolaşımdaki immün aktif moleküllerin seviyelerini değiştirerek olabilir. Bazı diyet bileşenleri ayrıca inflamasyon sürecini düzenleyen ve maternal/fetal inflamatuvar yanıtları modüle eden belirli transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girebilir[57].

Bu açıdan bakıldığında literatürde maternal beslenme ve mikroglial aktivasyon ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olup[61] ; bizim çalışmamızda da Iba1 immunreaktivitesi ise 7. günde özellikle prefrontal kortekste tüm diyet gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermişken; hipokampüste Iba1 aktivasyonu sayısal olarak anlamlı değildi. 28. günde ise inflamazom aktivasyonunun da belirgin olduğu doymuş yağ asitleri ve Omega6/Omega3 oranının yüksek

olduğu yüksek yağlı diyet gruplarında mikrogliyal aktivasyonda da artış devam ederken ; Omega3 oranının yüksek olduğu yüksek yağlı diyet grubunda mikrogliyal aktivasyon diğer gruplara göre azalmıştı. Hipokampüste tüm bölgelerde 28. günde IL1 β ve Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri Kontrol grubuna göre doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubu ve Omega6/Omega3 oranının yüksek olduğu yüksek yağlı diyet grubunda anlamlı olarak artmıştı. Omega3 oranının yüksek olduğu yüksek yağlı diyet grubunda ise tüm değerlerde pozitif hücre sayısında azalma gözlemlendi yani inflamasyonu azaltmıştı. NOTCH sinyal yolağının incelendiği maternal yüksek yağlı diyet modelinde, hipotalamustaki inflamatuvar belirteçler 28. günde Kontrole kıyasla artmışken, 0. Gündeki inflamatuvar belirteçler olan TNF-a ve IL1 β seviyeleri Kontrole kıyasla değişmemişti[36] Bizim çalışmamızda ise 7. günde prefrontal kortekste NLRP3, IL1 β ve Kaspaz-1 seviyeleri Kontrol grubuna benzer iken, Omega 6'nın yüksek olduğu grupta anlamlı olarak düşüktü. Ancak mikrogliyal aktivasyon (Iba1 boyanması) tüm diyet gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Hipokampüste CA1, CA3 ve GD bölgelerinde, IL1 β , Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak artmıştı. Bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyetin inflamasyonu Omega6 dan zengin yüksek yağlı diyet grubuna göre daha çok tetiklemesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Mikrogliyanın fonksiyonel rolü genel olarak merkezi sinir sisteminin nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalıkları ile ilişkilendirilen bağışıklık yanıtına odaklanmaktadır.Homeostaz ve beyin gelişimi sürecindeki rolleri araştırılmaya devam edilmektedir[10].

Bakteriyel endotoksin, lipopolisakkarit (LPS), beyin gelişimini olumsuz etkiler ve yenidoğan beyin hasarının hayvan modellerinde inflamatuvar bir yanıtı indüklemek için yaygın olarak kullanılır[85]. LPS kaynaklı beyin inflamasyonu, proapoptotik sitokin salınımı ile karakterize edilir ve seçici beyaz cevher hasarı ile sonuçlanır. Hayvan modellerinde, hipotansiyon, serebral kan akışının azalmasından belirgin sistemik inflamasyona kadar değişen sonuçlarla değişen dozlar (0.3 mg/kg'dan 100'e kadar) kullanılır [85]. Biz de çalışmamızda 6 mg/kg LPS uyguladık. Bizim modelimizde ise inflamazom aktivasyonunun beyin üzerinde etkisinin olup olmadığını doğrulamak amacıyla LPS grubu oluşturduk. Doğum ağırlıkları 7. ve 28. günde LPS grubu Kontrol grubuna göre düşük ağırlıktaydı. 7. günde beyin ağırlıkları da Kontrol grubuna göre düşüktü. Nöronal hasar da açısından incelendiğinde 7. günde hem prefrontal korteks hem de hipokampusün CA1, CA3 ve GD bölgelerinde LPS grubunun nöron sayısı tüm gruplara göre düşüktü. 28. Günde

ise sadece hipokampüste diğer gruplara göre anlamlı olarak düşüktü. Bununla birlikte inflamasyonu artırıcı özelliğini doğrulayacak şekilde NLRP3, IL1 β , Kaspaz-1 ve Iba1 belirteçleri tüm gruplara göre hem 7. hem de 28. günde anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi.

KISITLILIKLAR

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar bulunmaktaydı. Bu kısıtlılıklar proje bütçesinin kısıtlı olması ve etik açıdan hayvan kısıtlamasına dayanmaktaydı. Bunlardan biri maternal inflamasyonu destekleyen maternal beslenme tipi+LPS gruplarının yapılamamasıydı. Her grupta yapılan gruplara ek olarak LPS'li grupların eklenmesi inflamasyonu azaltan beslenme etkeninin farkını ortaya koyabilirdi. İkinci kısıtlılığımız diyet farklarının incelenmesi için nöronal gelişim döneminde in utero olarak nöroenez belirteçlerinin incelenmemesiydi. Üçüncü kısıtlılığımız ise 7. gün ve 28. günde elde edilen yavrularda sayı kısıtlılığı nedeniyle erkek ve dişi farklarının incelenmemesiydi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, fare modelinde hamilelik ve emzirme döneminde Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle beslenme doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyetle göre nöron gelişimi ve inflamazom aktivasyonu açısından daha olumlu etkiler gösterdi. Omega-6'dan zengin olan gruptaki bu olumlu etkinin Omega-3 içeriği ya da omega-6/omega 3 oranının literatürde belirtilen çok yüksek oranlara kıyasla daha az oranda olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Bununla birlikte hem doymuş yağ asitlerinden zengin yüksek yağlı diyet hem de Omega-6 ve Omega-3'ün oranlarının farklı olduğu yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda mikrogial aktivasyonun Kontrol grubuna artmış olması inflamazom aktivasyonun fagosit düzeyinde aktif olduğunu gösterdi. LPS grubu ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu doğrulandı. Doğum öncesi Omega-6 ve Omega-3 içeriğinin yüksek olduğu maruziyetinin beyin gelişimi üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

7. günde sadece kontrole göre doymuş yağ asitlerinden zengin grup için hipokampusun GD bölgesinde inflamasyon artışı gözlemlendi. Yani annenin yüksek yağlı diyet ile beslenmesi prenatal

dönemde yavru beyindeki inflamasyonu çok fazla etkilemezken emzirme döneminde annenin yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam ediyor olması 28. Günde tüm bölgeler için NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden oldu. Sonuç olarak annenin yüksek yağlı diyet ile beslenmesi emzirme döneminde beyinde NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve nöronal hasar açısından daha etkiliydi.

28. günde inflamasyonda artış beklenen gruplarda emzirme ile birlikte nöron sayısında azalma belirgin hale geldi, ancak Omega6/3:2:1 grupta omega 3 ün koruyucu etkisi tüm gruplara kıyasla belirgindi. Maternal beslenmeye oranla anne sütü ile beslenmenin prefrontal korteksteki nöron sayılarına etkisi olduğu belirlendi.

Hipokampüste CA1 ve CA3 bölgesinde gözlenen hem 7. gün hem de 28. günlerdeki nöron sayısı farkları prefrontal korteks ile benzerken, GD nöron sayıları her iki dönem için de anne diyeti ve emzirme döneminden en çok etkilenen bölgeydi.

Prefrontal kortekste 7. Günde IL1 β ve Kaspaz-1, Iba1 ve NLRP3 seviyeleri LPS grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak artmıştı. IL1 β seviyeleri Omega 3 yüksek olan grupta da doymuş yağ asitlerinden zengin diyet grubuna göre anlamlı olarak azalmışken Kaspaz-1 oranı Omega 3 yüksek olan grupta tüm gruplara göre azalmıştı. Ancak mikrogial aktivasyon tüm yem gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı.

Hipokampüste CA1, CA3 ve GD bölgelerinde, IL1 β , Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri LPS ve DYA-YYD grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak artmıştı. Iba1 ise sadece LPS grubunda kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı yüksekti.

Prefrontal kortekste 28. günde IL1 β ve Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri Kontrol grubuna göre LPS, DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı. Omega 3 ün yüksek olduğu grupta ise tüm pozitif hücrelerde azalma gözlemlendi.

Iba1 LPS grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksekti, bununla birlikte kontrol grubuna göre YYD ve Omega6 grubunda mikrogial aktivasyonda artış devam ederken Omega3 grubunda mikrogial aktivasyon azalmıştı.

Hipokampüste tüm bölgelerde 28. günde IL1 β ve Kaspaz-1 ve NLRP3 seviyeleri Kontrol grubuna göre LPS, DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD grubunda anlamlı olarak artmıştı. O6/O3:2/1-YYD grubunda ise tüm pozitif hücrelerde azalma gözlemlendi yani inflamasyonu azaltmıştı. Iba1 LPS

grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksekti . O6/O3:20/1-YYD ile beslenen grupta genel olarak tüm bölgelerde DYA-YYD'ye göre azalmışken; O6/O3:2/1-YYD , DYA-YYD ve O6/O3:20/1-YYD gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştı.

7.gün ile 28. günlerde maternal beslenmenin etkisini yavru beyindeki inflamasyon açısından karşılaştırdığımızda ;maternal beslenme prefrontal korteks için inflamasyon artışında belirgin bir fark oluşturmazken annenin emzirme döneminde yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam etmesi 28. Günde inflamasyon artışına neden olmuştur. Omega3 ün koruyucu etkisi önemlidir.

Gebelik döneminde annenin sadece doymuş yağ asitlerinden zengin besin ile beslenmesi hipokampüste inflamasyonu artırırken, emzirme döneminde annenin yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam etmesi O6/O3:2/1-YYD grubunda da 28. Günde inflamasyon artışına neden olmuştur.

Genel olarak değerlendirilğinde Omega6 oranının yüksek olması prenatal dönemdeki anne beslenmesi açısından önemli olmaz iken emzirme döneminde bu oranın yüksek olması inflasyonu arttırmıştır.

Omega3 yüksek beslenmenin inflamasyon belirteçlerini tüm beyinde hem gebelik hem de emzirme döneminde nöronal hasar ve inflamasyonu gerilettili.

6. KAYNAKÇA

- [1] R. Erzurumlu, G. Şengül, and E. Ulupınar, *NÖROANATOMİ*. Güneş Tıp Kitabevleri, 2019.
- [2] T. W. Sadler, “Langman’s Medical Embryology Thomas W. Sadler.” USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
- [3] D. J. Brat, “Normal Brain Histopathology,” in *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*, Elsevier, 2018, pp. 19–37. doi: 10.1016/B978-0-323-44941-0.00002-3.
- [4] N. Swinnen *et al.*, “Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo,” *Glia*, vol. 61, no. 2, pp. 150–163, Feb. 2013, doi: 10.1002/glia.22421.
- [5] M. Prinz, S. Jung, and J. Priller, “Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts,” *Cell*, vol. 179, no. 2, pp. 292–311, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.08.053.
- [6] M. S. Thion, F. Ginhoux, and S. Garel, “Microglia and early brain development: An intimate journey,” *Science (1979)*, vol. 362, no. 6411, pp. 185–189, Oct. 2018, doi: 10.1126/science.aat0474.
- [7] M. S. Thion and S. Garel, “On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development,” *Curr Opin Neurobiol*, vol. 47, pp. 121–130, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.conb.2017.10.004.
- [8] Y.-L. Tan, Y. Yuan, and L. Tian, “Microglial regional heterogeneity and its role in the brain,” *Mol Psychiatry*, vol. 25, no. 2, pp. 351–367, 2020, doi: 10.1038/s41380-019-0609-8.
- [9] N. Hagemeyer *et al.*, “Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood,” *Acta Neuropathol*, vol. 134, no. 3, pp. 441–458, Sep. 2017, doi: 10.1007/s00401-017-1747-1.
- [10] A. Wlodarczyk *et al.*, “A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain,” *EMBO J*, vol. 36, no. 22, pp. 3292–3308, Nov. 2017, doi: 10.15252/embj.201696056.
- [11] S. M.-T. Smolders, S. Kessels, T. Vanganswinkel, J.-M. Rigo, P. Legendre, and B. Brône, “Microglia: Brain cells on the move,” *Prog Neurobiol*, vol. 178, p. 101612, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.04.001.
- [12] M. L. Bennett *et al.*, “New tools for studying microglia in the mouse and human CNS,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 12, Mar. 2016, doi: 10.1073/pnas.1525528113.
- [13] T. L. Tay, J. C. Savage, C. W. Hui, K. Bisht, and M.-È. Tremblay, “Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition,” *J Physiol*, vol. 595, no. 6, pp. 1929–1945, Mar. 2017, doi: 10.1113/JP272134.
- [14] M. Nikodemova, R. S. Kimyon, I. De, A. L. Small, L. S. Collier, and J. J. Watters, “Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week,” *J Neuroimmunol*, vol. 278, pp. 280–8, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.018.

- [15] K. Borst, A. A. Dumas, and M. Prinz, "Microglia: Immune and non-immune functions," *Immunity*, vol. 54, no. 10, pp. 2194–2208, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.immuni.2021.09.014.
- [16] F. L. Cardoso *et al.*, "Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects," *J Neuroinflammation*, vol. 12, no. 1, p. 82, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12974-015-0299-3.
- [17] Y. İzci and Y. C. Erbaş, "Hippocampus: Its structure and functions," *Türk Nöroşir Derg*, vol. 25, no. 3, pp. 287–295, 2015.
- [18] C. Schultz and M. Engelhardt, "Anatomy of the Hippocampal Formation," 2014, pp. 6–17. doi: 10.1159/000360925.
- [19] D. G. Amaral, H. E. Scharfman, and P. Lavenex, "The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)," 2007, pp. 3–790. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5.
- [20] M. Carlén, "What constitutes the prefrontal cortex?," *Science (1979)*, vol. 358, no. 6362, pp. 478–482, Oct. 2017, doi: 10.1126/science.aan8868.
- [21] P. G. Anastasiades and A. G. Carter, "Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex," *Trends Neurosci*, vol. 44, no. 7, pp. 550–563, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.tins.2021.03.006.
- [22] B. L. Tan and M. E. Norhaizan, "Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function," *Nutrients*, vol. 11, no. 11, p. 2579, Oct. 2019, doi: 10.3390/nu11112579.
- [23] Y. Chen, Q. Qian, and J. Yu, "Carbenoxolone ameliorates insulin sensitivity in obese mice induced by high fat diet via regulating the I κ B- α /NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 115, p. 108868, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108868.
- [24] A. H. de Mello *et al.*, "Omega-3 Fatty Acids Attenuate Brain Alterations in High-Fat Diet-Induced Obesity Model," *Mol Neurobiol*, vol. 56, no. 1, pp. 513–524, Jan. 2019, doi: 10.1007/s12035-018-1097-6.
- [25] M. R. Langley *et al.*, "High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1866, no. 3, p. 165630, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.bbdis.2019.165630.
- [26] F. Mirzaei, M. Khazaei, A. Komaki, I. Amiri, and C. Jalili, "Virgin coconut oil (VCO) by normalizing NLRP3 inflammasome showed potential neuroprotective effects in Amyloid- β induced toxicity and high-fat diet fed rat," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 118, pp. 68–83, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.fct.2018.04.064.
- [27] E. L. Sullivan, K. M. Riper, R. Lockard, and J. C. Valteau, "Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior," *Horm Behav*, vol. 76, pp. 153–161, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.008.
- [28] C. Mardare *et al.*, "Endurance and Resistance Training Affect High Fat Diet-Induced Increase of Ceramides, Inflammasome Expression, and Systemic Inflammation in Mice," *J Diabetes Res*, vol. 2016, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1155/2016/4536470.
- [29] R. Gonzalo-Gobernado *et al.*, "Neuroprotective Effects of Diets Containing Olive Oil and DHA/EPA in a Mouse Model of Cerebral Ischemia," *Nutrients*, vol. 11, no. 5, p. 1109, May 2019, doi: 10.3390/nu11051109.

- [30] N. Hariri and L. Thibault, "High-fat diet-induced obesity in animal models," *Nutr Res Rev*, vol. 23, no. 2, pp. 270–299, Dec. 2010, doi: 10.1017/S0954422410000168.
- [31] A. Simopoulos, "An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity," *Nutrients*, vol. 8, no. 3, p. 128, Mar. 2016, doi: 10.3390/nu8030128.
- [32] M. López-Vicente *et al.*, "Prenatal Omega-6:Omega-3 Ratio and Attention Deficit and Hyperactivity Disorder Symptoms," *J Pediatr*, vol. 209, pp. 204–211.e4, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.jpeds.2019.02.022.
- [33] R. K. Saini and Y.-S. Keum, "Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review," *Life Sci*, vol. 203, pp. 255–267, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.
- [34] M. E. Santillán *et al.*, "Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different ω -6: ω -3 ratios in mice," *Nutrition*, vol. 26, no. 4, pp. 423–431, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.nut.2009.06.005.
- [35] M. E. Cerf, "High Fat Programming and Cardiovascular Disease," *Medicina (B Aires)*, vol. 54, no. 5, p. 86, Nov. 2018, doi: 10.3390/medicina54050086.
- [36] S. F. Lemes *et al.*, "Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring," *Neuroscience*, vol. 371, pp. 1–15, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.11.043.
- [37] M. M. Almeida *et al.*, "Maternal high-fat diet impairs leptin signaling and up-regulates type-1 cannabinoid receptor with sex-specific epigenetic changes in the hypothalamus of newborn rats," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 103, pp. 306–315, May 2019, doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.02.004.
- [38] P. A. Garay, E. Y. Hsiao, P. H. Patterson, and A. K. McAllister, "Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development," *Brain Behav Immun*, vol. 31, pp. 54–68, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.008.
- [39] N. Wada *et al.*, "Maternal high-fat diet exaggerates diet-induced insulin resistance in adult offspring by enhancing inflammasome activation through noncanonical pathway of caspase-11," *Mol Metab*, vol. 37, p. 100988, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.molmet.2020.100988.
- [40] J. A. Rodríguez-Gómez *et al.*, "Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response," *Cells*, vol. 9, no. 7, p. 1717, Jul. 2020, doi: 10.3390/cells9071717.
- [41] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, "Pathogen Recognition by the Innate Immune System," *Int Rev Immunol*, vol. 30, no. 1, pp. 16–34, Jan. 2011, doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
- [42] K. Kersse, M. J. M. Bertrand, M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, "NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death," *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 22, no. 5–6, pp. 257–276, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.09.003.
- [43] Y. He, H. Hara, and G. Núñez, "Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation," *Trends Biochem Sci*, vol. 41, no. 12, pp. 1012–1021, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002.
- [44] T. Próchnicki, M. S. Mangan, and E. Latz, "Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation," *F1000Res*, vol. 5, p. 1469, Jun. 2016, doi: 10.12688/f1000research.8614.1.

- [45] G. Guarda and A. So, "Regulation of inflammasome activity," *Immunology*, vol. 130, no. 3, pp. 329–336, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03283.x.
- [46] Y. Huang, W. Xu, and R. Zhou, "NLRP3 inflammasome activation and cell death," *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 9, pp. 2114–2127, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41423-021-00740-6.
- [47] J. Tschopp and K. Schroder, "NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production?," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 3, pp. 210–215, Mar. 2010, doi: 10.1038/nri2725.
- [48] L. Zitvogel, O. Kepp, L. Galluzzi, and G. Kroemer, "Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses," *Nat Immunol*, vol. 13, no. 4, pp. 343–351, Apr. 2012, doi: 10.1038/ni.2224.
- [49] M. Hu, Y. Lin, B. Zhang, D. Lu, Z. Lu, and W. Cai, "Update of inflammasome activation in microglia/macrophage in aging and aging-related disease," *CNS Neurosci Ther*, vol. 25, no. 12, pp. 1299–1307, Dec. 2019, doi: 10.1111/cns.13262.
- [50] G. B. Choi *et al.*, "The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring," *Science (1979)*, vol. 351, no. 6276, pp. 933–939, Feb. 2016, doi: 10.1126/science.aad0314.
- [51] S. Kim *et al.*, "Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring," *Nature*, vol. 549, no. 7673, pp. 528–532, Sep. 2017, doi: 10.1038/nature23910.
- [52] M. Marino *et al.*, "Neuroinflammation: Molecular Mechanisms And Therapeutic Perspectives," *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, vol. 22, no. 3, pp. 160–174, Dec. 2022, doi: 10.2174/1871524922666220929153215.
- [53] X. F. Hu, G. G. Liu, and M. Fan, "Long-Term Effects of Famine on Chronic Diseases: Evidence from China's Great Leap Forward Famine," *Health Econ*, vol. 26, no. 7, pp. 922–936, 2017.
- [54] M. Li, E. Francis, S. N. Hinkle, A. S. Ajjarapu, and C. Zhang, "Preconception and prenatal nutrition and neurodevelopmental disorders: a systematic review and meta-analysis," *Nutrients*, vol. 11, no. 7, p. 1628, 2019.
- [55] E. L. Prado and K. G. Dewey, "Nutrition and brain development in early life," *Nutr Rev*, vol. 72, no. 4, pp. 267–284, 2014.
- [56] A. G. Edlow, F. Guedj, D. Sverdlov, J. L. A. Pennings, and D. W. Bianchi, "Significant effects of maternal diet during pregnancy on the murine fetal brain transcriptome and offspring behavior," *Front Neurosci*, vol. 13, p. 1335, 2019.
- [57] M. Bordeleau, L. Fernández de Cossío, M. M. Chakravarty, and M.-È. Tremblay, "From maternal diet to neurodevelopmental disorders: a story of neuroinflammation," *Front Cell Neurosci*, vol. 14, p. 612705, 2021.
- [58] L. Song, L. Pei, S. Yao, Y. Wu, and Y. Shang, "NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies," *Front Cell Neurosci*, vol. 11, p. 63, 2017.
- [59] S. Ghosh, E. Castillo, E. S. Frias, and R. A. Swanson, "Bioenergetic regulation of microglia," *Glia*, vol. 66, no. 6, pp. 1200–1212, 2018.
- [60] C. T. Dias *et al.*, "Maternal high-fat diet stimulates proinflammatory pathway and increases the expression of Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adolescent mice hippocampus," *Neurochem Int*, vol. 139, p. 104781, 2020.

- [61] S. Xavier, A. Soch, S. Younesi, S. Malik, S. J. Spencer, and L. Sominsky, "Maternal diet before and during pregnancy modulates microglial activation and neurogenesis in the postpartum rat brain," *Brain Behav Immun*, vol. 98, pp. 185–197, 2021.
- [62] K. Toboła-Wróbel, M. Pietryga, P. Dydowicz, M. Napierała, J. Brązert, and E. Florek, "Association of oxidative stress on pregnancy," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2020, 2020.
- [63] Z. Sultana, K. Maiti, J. Aitken, J. Morris, L. Dedman, and R. Smith, "Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 77, no. 5, p. e12653, 2017.
- [64] I. Mert *et al.*, "Role of oxidative stress in preeclampsia and intrauterine growth restriction," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, vol. 38, no. 4, pp. 658–664, 2012.
- [65] K. K. Ferguson, Y.-H. Chen, T. J. VanderWeele, T. F. McElrath, J. D. Meeker, and B. Mukherjee, "Mediation of the relationship between maternal phthalate exposure and preterm birth by oxidative stress with repeated measurements across pregnancy," *Environ Health Perspect*, vol. 125, no. 3, pp. 488–494, 2017.
- [66] J.-F. Bilodeau *et al.*, "Plasma F2-isoprostane class VI isomers at 12–18 weeks of pregnancy are associated with later occurrence of preeclampsia," *Free Radic Biol Med*, vol. 85, pp. 282–287, 2015.
- [67] E. G. Sley *et al.*, "Omega-3 fatty acid supplement use and oxidative stress levels in pregnancy," *PLoS One*, vol. 15, no. 10, p. e0240244, 2020.
- [68] C. Montgomery, B. K. Speake, A. Cameron, N. Sattar, and L. T. Weaver, "Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion," *British Journal of Nutrition*, vol. 90, no. 1, pp. 135–145, 2003.
- [69] S. M. Innis, "Essential fatty acid transfer and fetal development," *Placenta*, vol. 26, pp. S70–S75, 2005.
- [70] A. K. Duttaroy and S. Basak, "Maternal dietary fatty acids and their roles in human placental development," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 155, p. 102080, 2020.
- [71] P. Middleton, J. C. Gomersall, J. F. Gould, E. Shepherd, S. F. Olsen, and M. Makrides, "Omega-3 fatty acid addition during pregnancy," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 11, 2018.
- [72] A. L. Lépinay *et al.*, "sakayori," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 53, pp. 82–93, 2015.
- [73] M. Jouanne, S. Oddoux, A. Noël, and A. S. Voisin-Chiret, "Nutrient Requirements during Pregnancy and Lactation. Nutrients 2021, 13, 692." s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published ..., 2021.
- [74] C. Dennehy, "Omega-3 fatty acids and ginger in maternal health: Pharmacology, efficacy, and safety," *J Midwifery Womens Health*, vol. 56, no. 6, pp. 584–590, 2011.
- [75] N. Yamamoto, M. Saitoh, A. Moriuchi, M. Nomura, and H. Okuyama, "Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats," *J Lipid Res*, vol. 28, no. 2, pp. 144–151, 1987.
- [76] S. E. Carlson and M. Neuringer, "Polyunsaturated fatty acid status and neurodevelopment: a summary and critical analysis of the literature," *Lipids*, vol. 34, no. 2, pp. 171–178, 1999.

- [77] M. Neuringer, W. E. Connor, D. S. Lin, L. Barstad, and S. Luck, "Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, no. 11, pp. 4021–4025, 1986.
- [78] M. D. Saste, J. D. Carver, J. E. Stockard, V. J. Benford, L. T. Chen, and C. P. Phelps, "Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups," *J Nutr*, vol. 128, no. 4, pp. 740–743, 1998.
- [79] N. Sakayori *et al.*, "Maternal dietary imbalance between omega-6 and omega-3 fatty acids triggers the offspring's overeating in mice," *Commun Biol*, vol. 3, no. 1, pp. 1–13, 2020.
- [80] N. Sakayori *et al.*, "Maternal dietary imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids impairs neocortical development via epoxy metabolites," *Stem Cells*, vol. 34, no. 2, pp. 470–482, Feb. 2016, doi: 10.1002/stem.2246.
- [81] E. Yavin, E. Himovichi, and R. Eilam, "Delayed cell migration in the developing rat brain following maternal omega 3 alpha linolenic acid dietary deficiency," *Neuroscience*, vol. 162, no. 4, pp. 1011–1022, 2009.
- [82] D. Maysinger and I. Zhang, "Nutritional and nanotechnological modulators of microglia," *Front Immunol*, vol. 7, p. 270, 2016.
- [83] R. Hornedo-Ortega *et al.*, "Phenolic compounds characteristic of the mediterranean diet in mitigating microglia-mediated neuroinflammation," *Front Cell Neurosci*, vol. 12, p. 373, 2018.
- [84] K. Ozaki *et al.*, "Maternal immune activation induces sustained changes in fetal microglia motility," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2020.
- [85] J. Bakos, Z. Lestanova, V. Strbak, T. Havranek, and Z. Bacova, "Neonatal manipulation of oxytocin prevents lipopolysaccharide-induced decrease in gene expression of growth factors in two developmental stages of the female rat," *Neuropeptides*, vol. 48, no. 5, pp. 281–286, 2014.



Gündem No/Toplantı No/Yıl : 02/02/2022

Toplantı Tarihi : 19 Ocak 2022

Sayın, Prof. Dr. Ülker CANKURT
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

19/2021 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Annelerden Doğan Yenidoğan Beynindeki İnflamazom Aktivasyonunu İncelenmesi" isimli; Abdullah KUMRAL, Serap CİLAKEK MIÇILI, Fatma Sıla SOY, Kemal Uğur TÜFEKÇİ'nin araştırmacı olduğu, 20 adet gebe fare ve bunlardan doğacak 140 adet yenidoğan C57BL/6 fare talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede; proje yürütücüsü Kazım TUĞYAN'ın projeden ayrılıp yerine Ülker CANKURT'un projeye yürütücü olarak dahil olması hususunda bilgi edinilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri/Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof. Dr. Nazan UYSAL HARZADIN
Başkan Vekili

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Üye

Prof. Dr. Hatice NUR OLGUN
Üye

Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ SÜTPIDELER
Üye

Prof. Dr. Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Danışman

Prof. Dr. Gamze ÇAPA KAYA
Üye (Katılmadı)

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN
Üye

Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK
Üye

Prof. Dr. Pinar AKAN
Üye

Dr. Öğr. Gör. Sevim KANDİŞ
Üye

Doç. Dr. Kadri KULUALP
Üye

Öğr. Gör. Dr. Aslı ÇELİK
Üye

Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

Zehra KINAM
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.