



Kannabidiolün Lipopolisakkarit ile İndüklenen Gebelik Enflamasyon Modelindeki Sıçan Maternal ve Fetal Beyin Dokuları Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the Protective Effects of Cannabidiol on Rat Maternal and Fetal Brain Tissues in Lipopolysaccharide-induced Pregnancy Inflammation Model

✉ Deniz ÇATAKLI¹, ✉ Yalçın ERZURUMLU², ✉ Onur ERTUNÇ³, ✉ Serdar SEZER¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

³Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

ÖZ

Amaç: Preterm eylem (PE), dünya genelinde en yaygın yeni doğan ölüm nedenlerinden biridir ve gebelikte gelişen enflamasyonun, PE'in altında yatan sebeplerden biri olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında, *Cannabis sativa* L. bitkisinden izole edilen Kannabidiol (CBD)'ün gebelikte lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sistemik enflamasyon modelinde, enflamasyon ve oksidatif stres aracılı koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yetişkin Wistar albino gebe sıçanlar (n=30) rastgele 5 gruba ayrıldı; 1) Kontrol, 2) LPS, 3) LPS + CBD 5 mg/kg, 4) LPS + CBD 10 mg/kg ve 5) LPS + CBD 30 mg/kg. Deney protokolüne göre; gebeliğin 15, 16 ve 17. günlerinde, üç tedavi grubuna 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg dozlarında intraperitoneal (i.p.) CBD enjeksiyonları gerçekleştirildi. Son CBD enjeksiyonunu takiben 1 mg/kg LPS (i.p.) enjeksiyonu gerçekleştirildi. LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra fetal ve maternal beyin dokuları alındı. Alınan dokularda, CBD'nin enflamasyon ve oksidatif stres aracılı mekanizma üzerindeki etkisini anlamak amacıyla, hematoksilen-eozin boyama, immünohistokimyasal analiz, ELISA ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak enflamatuvar belirteçler; interlökin 1β (IL-1β), hipoksi ile indüklenen faktor-1α (HIF-1α), immün hücre aktivasyonun göstergesi olan CD45 ve oksidatif stres parametreleri; total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri değerlendirildi.

Bulgular: CBD uygulaması maternal beyin dokusunda LPS'ye bağlı olarak artan IL-1β düzeylerini ve CD45 ifade düzeylerini azaltmıştır. Ayrıca, CBD tedavisi; maternal ve fetal beyin dokularında TAS düzeylerini artırmıştır, TOS ve OSİ değerlerini azaltmıştır. CBD tedavisi oksidatif stres parametreleriyle paralel şekilde, maternal ve beyin dokularında HIF-1α ifade düzeylerini azaltmıştır.

Sonuç: CBD'nin LPS ile indüklenen gebelikte enflamasyon modelinde, enflamasyona bağlı olarak maternal ve fetal beyinde gelişen oksidatif stres üzerinde koruyucu etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, CBD'nin PE ve buna bağlı komplikasyonların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kannabidiol, enflamasyon, oksidatif stres, gebelik, preterm eylem

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Yalçın ERZURUMLU, Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

E-posta: yalcin.erzurumlu@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-6835-4436

Geliş Tarihi/Received: 21.04.2024 **Kabul Tarihi/Accepted:** 11.12.2024 **Yayınlanma Tarihi/Publication Date:** 06.03.2025

Atıf/Cite this article as: Çatakli D, Erzurumlu Y, Ertunç O, Sezer S. Investigation of the protective effects of cannabidiol on rat maternal and fetal brain tissues in lipopolysaccharide-induced pregnancy inflammation model. Nam Kem Med J. 2025;13(1):13-23



©Telif Hakkı 2025 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2025 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

ABSTRACT

Aim: Preterm labor (PE) is one of the most common causes of neonatal death world-wide and inflammation during pregnancy is thought to be one of the underlying causes of PE. In this study, inflammation and oxidative stress-mediated protective effects of Cannabidiol (CBD) isolated from *Cannabis sativa* L. were investigated in a lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation model in pregnancy.

Materials and Methods: Adult Wistar albino pregnant rats (n=30) were randomly divided into 5 groups; 1) Control, 2) LPS, 3) LPS + CBD 5 mg/kg, 4) LPS + CBD 10 mg/kg and 5) LPS + CBD 30 mg/kg. On days 15, 16 and 17 of gestation, intraperitoneal (i.p.) CBD injections at doses of 5 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg were performed in the three treatment groups. Following the last CBD injection, 1 mg/kg LPS (i.p.) injection was performed. Fetal and maternal brain tissues were collected 6 hours after LPS injection. To understand the effect of CBD on inflammation and oxidative stress-mediated mechanisms in collected tissues, hematoxylin-eosin staining, immunohistochemical analysis, ELISA and biochemical methods were used to evaluate the levels of inflammatory markers interleukin 1 β (IL-1 β), hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α), immün cell activation marker CD45 and oxidative stress parameters; total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS) and oxidative stress index (OSI).

Results: CBD administration decreased increased IL-1 β levels and CD45 expression levels in maternal brain tissue due to LPS-mediated inflammation. Furthermore, CBD treatment increased TAS levels and decreased TOS and OSI values in maternal and fetal brain tissues. In parallel with oxidative stress parameters, CBD treatment decreased HIF-1 α expression levels in maternal and brain tissues.

Conclusion: CBD may have a protective effect on oxidative stress in the maternal and fetal brain due to inflammation in the LPS-induced pregnancy inflammation model. These results suggest that CBD may be a potential agent in the prevention and treatment of PE and related complications.

Keywords: Cannabidiol, inflammation, oxidative stress, pregnancy, preterm labor

GİRİŞ

Preterm eylem (PE), gebeliğin 37. haftası öncesinde gerçekleşen doğum olarak tanımlanmakta olup, dünya çapında gebeliklerin %10'undan fazlasını etkilediği bilinmektedir¹. Bununla PE, yenidoğan ölüm nedenlerinden biridir. Hayatta kalan bebeklerin ise daha sonraki yaşamlarında enfeksiyon, nörogelişimsel ve kardiyometabolik bozukluklar için yüksek bir risk oluşturabilmektedir²⁻⁴. İkiz gebelikler, koryoamniyonit, genetik faktörler, annede var olan hastalıklar, önceden gerçekleşen PE gibi çeşitli faktörler erken doğum için bilinen risk faktörleridir⁵⁻⁷. Ayrıca, artan kanıtlar enflamasyonun ve oksidatif stresin de erken doğumda önemli rolü olduğunu göstermektedir^{8,9}.

Gebelik döneminde meydana gelen enflamasyon sürecini aydınlatmak için, enflamasyon sürecinde ortaya çıkan ve gebelik komplikasyonlarıyla ilişkilendirilen fetö-maternal bağışıklık toleransında gerçekleşen bozulmanın anlaşılması gerektiği düşünülmektedir^{10,11}. Obezite, gestasyonel diyabet, preeklampsi, sigara kullanımı, çevresel kirliliğe mağruziyet, düşük sosyo-ekonomik durum, depresyon, stres, otoimmün hastalıklar, astım ve enfeksiyon da dahil olmak üzere enflamatuvar sürece sahip birçok faktörün maternal bağışıklık aktivasyonuna katkıda bulunduğu saptanmıştır¹². PE için temel risk faktörleri günümüzde halen belirsizdir, ancak artan kanıtlar düzensiz enflamatuvar yanıt ve oksidatif stresin de PE'de merkezi rolü olduğunu desteklemektedir⁹. Enflamasyon ve oksidatif stresin düzenlemesi sağlıklı bir gebelik için önemli bir bileşendir. Maternal enflamasyon sırasında meydana gelen değişiklikler hem anne hem de fetüs sağlığının korunmasına yardımcı olmaktadır¹³. Sağlıklı gebelik, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretiminin meydana geldiği, oksidatif stresin karakterize ettiği, serbest anti-oksidanların plazma seviyelerinin azaldığı ve pürin

katabolizmasının arttığı bir oksidan dönem olarak karakterize edilir¹⁴. PE'de dahil olmak üzere birçok gebelikle ilgili bozuklukta gözlenen bu oksidan özellikler daha da kötüleşebilmektedir. PE'de meydana gelen oksidatif stres, enflamatuvar yanıt olarak TNF- α ve interlökin (IL)-6 gibi sitokinlerin üretiminde artışa, IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokin üretiminde azalmaya neden olarak hücre hasarına yol açabilmektedir^{15,16}.

Oksidatif stres, ROS veya reaktif nitrojen türlerinin üretimi ile savunma amaçlı anti-oksidanların koruyucu kapasitesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Reaktif türlerin ve hücrelerdeki oksidatif hasarın kontrolünden sorumlu anti-oksidan sistem aracılığıyla ya da enzimatik veya enzimatik olmayan endojen mekanizmalar yoluyla üretilebilmektedir¹⁷. Oksidatif stres, gebeliğin erken dönemlerinden itibaren gelişmektedir. Gebe kadınlarda gebe olmayan kadınlara kıyasla daha yüksek lipid peroksidasyonu gözlenmektedir¹⁸. Serbest reaktif radikallerinin aşırı üretiminin hücre yapısında hasara ve sonuç olarak ilk trimesterde abortus, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği dahil olmak üzere gebelik bozuklukları riskini artırdığı bilinmektedir¹⁹⁻²¹.

Gebelikte maternal ve fetal pro-enflamatuvar yanıtların azaltılmasının fetüsün enflamasyondan korunmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda PE ve buna bağlı olarak gelişebilecek serebral palsi, otizm spektrum bozukluğu gibi nörogelişimsel bozuklukları önlemek amacıyla magnezyum sülfat, folik asit, melatonin ve N-asetil sistein gibi ajanların nöroprotektif etkisi olabileceği gösterilmiştir²²⁻²⁵. Ancak, mevcut ajanların fetal beyin üzerindeki olası nöroprotektif etkileri ve kullanımlarının güvenliği hakkında tartışmalar devam etmektedir. Bu nedenle özellikle günümüzde doğal kaynaklardan izole edilen ve geliştirilen güvenilir moleküllere olan ihtiyaç devam etmektedir.

Cannabis sativa L. bitkisindeki birincil öforik olmayan bileşenlerden biri olan kannabidiol (CBD), Lennox-Gastaut sendromu ve Dravet sendromlu hastalarda terapötik olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, CBD ve Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) gibi kannabinoid moleküllerin anti-enflamatuvar, anti-oksidan ve nöroprotektif özelliklerine dikkat çekmiştir^{26,27}. Oksidatif stres ve enflamasyon sürecinin birbirleriyle bağlantılı olduğunun düşünüldüğü PE patogenezinde, hastalığa bağlı çeşitli mekanizmalar varsayılmasına rağmen, mevcut tedavilerin term eyleme bağlı sonuçları hafiflettiği fakat ilerlemesini önlemek için yeterli olmadığı bilinmektedir.

Paylaşılan tüm bu bilgilerden yola çıkarak bu araştırma çalışmasında anti-oksidan ve anti-enflamatuvar etkileri olduğu kanıtlanan CBD'nin gebe sıçanlarda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen enflamasyon modelinde fetal ve maternal beyinde gelişen enflamasyonun neden olduğu oksidatif stres süreci üzerindeki olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kimyasallar

CBD, Süleyman Demirel Üniversitesi-Doğal Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. CBD'nin kaynağı *Cannabis sativa* L. ekstresidir. CBD içeriği >99.9 ve THC içeriği <0,01 olup, kalıntı alkol ve ağır metal limitleri USP ve AB farmakopelerine uygundur. CBD %100 etanol (Merck Chemicals, \geq %99,9) içinde çözülmüştür. *Escherichia coli* O:127:B8 (#L3129) kaynaklı LPS Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Fare monoklonal anti-CD45 (#M0701) Dako'dan ve fare poliklonal anti-hipoksi ile indüklenen faktor-1 α (HIF-1 α) (#MC0224) Medaysis'ten satın alınmıştır.

Deney Protokolü

Bu çalışmadaki tüm hayvan bakımı ve deneysel prosedürler, Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin hayvan araştırmaları yönergelerine uygun olarak yürütülmüş ve Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Komitesi tarafından onaylanmıştır (karar no: 209, tarih: 21.09.2023). Otuz adet 250-300 gr ağırlığındaki dişi Wistar albino sıçanları her kafeste iki erkek ve 1 dişi olacak şekilde 22-24 °C sıcaklık ve %55-60 nem ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam koşullarında Euro type-IV kafeslerde barındırıldı. Çiftleşmeyi doğrulamak için 12 saat sonra dişi sıçanlardan vajinal sürüntü alındı ve sperm varlığı tespit edilen dişi sıçanlar için gebeliğin sıfıncı günü olarak kabul edildi. Gebeliği doğrulanmış olan sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldı.

Gruplar

Toplam 30 gebe sıçan, 1) Kontrol, 2) LPS, 3) LPS + CBD 5 mg/kg, 4) LPS + CBD 10mg/kg, 5) LPS + CBD 30 mg/kg olacak şekilde 5 gruba (grup başına n=6) ayrıldı. Gebeliğin 15, 16 ve 17. günlerinde, üç tedavi grubuna 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg dozlarında intraperitoneal (i.p.) CBD enjeksiyonları gerçekleştirildi. 17. gün son CBD enjeksiyonundan sonra 1 mg/kg dozunda 0.5 mL hacminde LPS (i.p.) ile sistemik enflamasyon modeli oluşturuldu. LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra ketamin (90 mg/kg)/ksilazin (8-10 mg/kg) ile abdominal insizyonu takiben histerotomi ile maternal ve fetal beyin dokuları alındı. LPS (#L2630) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

Hematoksilen-Eozin (H&E) Uygulama

Formalinle fikse edilmiş parafin bloklardan 4-5 μ m'lik kesitler alındı ve H&E boyalı slaytlar gross morfolojiyi görselleştirmek için incelendi.

İmmünohistokimyasal Uygulama

Fetal beyin ve maternal beyin dokularına ait bloklara klinik olarak onaylanmış CD45 (Dako, #M0701) ve HIF-1 α (Medaysis, #MC0224) antikoları uygulandı. Antikor dilüsyonları, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı. Dako Omnis tam otomatize numune hazırlama ve boyama sistemi kullanıldı. Doku örnekleri formalinle fikse edilmiş parafine gömülü bloklardan kesildi ve pozitif kontrol olarak insan tonsil dokusundan 4 μ m kalınlığında kesitler alındı. Antijen geri kazanımı için dokular Envision-FLEX (Carpinteria, CA, ABD), yüksek pH solüsyonu ile 97 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama tamponu ile iki dakika durulandı. Antijen geri kazanım adımından sonra, 30 dakika süre ile CD45 ve HIF-1 α primer antikor inkübasyonu gerçekleştirildi. Ardından lamlar yıkama tamponuyla 2 dakika boyunca durulandı. Ardından, Envision-FLEX peroksidaz bloke edici solüsyon 3 dakika boyunca uygulandı ve durulama işlemi gerçekleştirildi. Yirmi dakikalık Envision-FLEX/HRP inkübasyon adımından önce, lamlar sekonder antikor ile inkübe edildi. Ardından yıkama adımları uygulandı. Envision substrat çalışma solüsyonu kromojen olarak 5 dakika inkübe edildi ve yıkandı. Son olarak, zıt boyama için 3 dakika boyunca hematoksilen uygulandı.

Histopatolojik Değerlendirme

H&E kesitlerde doku morfolojisi ve hücreler immünohistokimyasal yöntem ile karşılaştırılarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal incelemede semikuantitatif skorlama yapılmıştır. CD45 ile 200X büyütmede boyanan hücreler negatif (skor: 0), 5-25 hücre (skor: 1), 26-50 hücre (skor: 2) ve >50 (skor: 3) olarak kabul edildi. HIF-1 α için dokuda ve hücrelerde oransal olarak; negatif boyanma

0, >0% ve ≤0%25 doku ekspresyonu zayıf (skor: 1), >25 ve ≤0%50 doku ekspresyonu orta (skor: 2), >0%50 doku ekspresyonu yüksek (skor: 3) olarak kabul edildi^{28,29}.

Total Oksidan Düzeylerinin (TOS) Belirlenmesi

Serum TOS ölçümü, Erel³⁰ tarafından geliştirilen otomatik ölçüm yöntemi olan Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanılarak üretici firmanın önermiş olduğu protokol adımları takip edilerek belirlendi. Numunede bulunan oksidanlar demir iyonu o-dianisidin kompleksini Fe⁺³'e oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bulunan gliserol molekülleri tarafından güçlendirilir. Fe⁺³ iyonu, asidik ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu numunede bulunan oksidan moleküllerinin miktarıyla ilişkilendirilmektedir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, 45 µL örnek veya standart veya H₂O 96 kuyucuklu plakalara eklendi. Daha sonra, tampon solüsyonu ve sülfürik asit (H₂SO₄) içeren 300 µl reaktif 1 solüsyonu kuyucuklara eklendi ve 30 saniye inkübasyonun ardından 530 nm'de spektrofotometrede ilk absorbans değeri ölçüldü. Bu basamağı takiben, 15 µl substrat solüsyonu, H₂SO₄, ferröz iyon ve o-dianisidin'den oluşan reaktif 2 solüsyonu eklendi. 37 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından ikinci absorbans değeri 530 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Hidrojen peroksit (H₂O₂) kalibrasyon için kullanıldı ve sonuçlar litre başına mikromolar H₂O₂ eşdeğerleri (µmol H₂O₂ eq/L) cinsinden ifade edildi³¹. Sonuçlar kat değişimi ve ± standart sapma (SS) olarak grafikte sunuldu.

Total Antioksidan Düzeylerinin (TAS) Belirlenmesi

Serum TAS ölçümü, Erel³² tarafından geliştirilen otomatik ölçüm yöntemi olan Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) kiti kullanılarak üretici firmanın önermiş olduğu protokol adımları takip edilerek belirlendi. İlk olarak 96 kuyucuklu plakalara 18 µL örnek veya standart veya H₂O eklendi. Ardından 300 µL tampon solüsyonu ve asetat tamponundan oluşan reaktif 1 eklendi ve 30 saniye sonra ilk absorbans 660 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Ölçüm sonrası her bir kuyucuğa 45 µL prokromojen ve ABTS içeren reaktif 2 eklendi ve 37 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından ikinci absorbans değeri 660 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Bu yöntem doğrultusunda, üretilen hidroksil radikali tarafından başlatılan güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı numune içerisindeki antioksidan miktarı saptandı. Sonuçlar litre başına Trolox eşdeğerlerinin milimolü (eq/L) olarak ifade edildi³¹. Sonuçlar kat değişimi ve ± SS olarak grafikte sunuldu.

Oksidatif Stres İndeksi'nin (OSİ) Hesaplanması

OSİ oranı, TOS'un TAS seviyesine oranı olarak hesaplandı ve yüzde olarak ifade edildi. Bu hesaplama için TAS birimleri mmol/L olarak değerlendirmeye alındı ve OSİ değeri [TOS

(µM H₂O₂ eq/L)/TAS(mmol Trolox eq/L)×100] formülüne göre hesaplandı^{30,31}. Sonuçlar kat değişimi ve ±SS olarak grafikte sunuldu.

İnterlökin-1beta (IL-1β) Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

Sakrifikasyonun ardından sıçanlardan alınan fetal ve maternal beyin dokuları 50-100 mg aralığında olacak şekilde porsiyonlandı. 1:10 oranında 1xPBS eklenerek sonikasyon işlemi ile homojenize edildi. Maternal ve fetal beyin dokularında IL-1β miktar tayinini gerçekleştirmek amacıyla ticari olarak temin edilen ELISA kiti (Cloud Clone Corp, USCN, #L211201990) kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarını takiben, 1xPBS ile 1:9 oranında homojenize edilen 100 µL doku örneği veya standartlar anti-IL-1β antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plakalara eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklara sırasıyla substrat çözeltisi ve reaksiyonu sonlandıran çözelti eklendi. Takiben optik absorbans 450 nm'de spektrofotometrede (BioTek, Epoch2) ölçüldü. Doku örneklerindeki IL-1β seviyeleri, standartların optik dansite değerleri kullanılarak oluşturulan grafik üzerindeki doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Veriler GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve Tukey's post-hoc t-testi kontrol ve deney grupları arasında farklılıkların istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için kullanıldı. Farklılıklar p<0,05 için anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Fetal Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametrelerinin İncelenmesi

Gebelikte LPS ile indüklenen enflamasyon modelinde, enflamasyon-aracılı gelişen oksidatif stres düzeylerini değerlendirmek amacıyla fetal beyin dokularında TAS, TOS ve OSİ düzeylerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre fetal beyin dokularında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LPS grubunda TAS düzeylerinde azalma olduğu belirlendi (Şekil 1A). Ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. LPS grubuna kıyasla LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg gruplarında TAS düzeylerinde artış olduğu gözlenmesine karşın bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 1A). LPS grubuna kıyasla LPS + CBD 30 mg/kg grubu karşılaştırıldığında TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi (p<0,05) (Şekil 1A).

LPS uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla TOS düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu belirlendi (p<0,05) (Şekil 1B). LPS grubu ile LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg grupları karşılaştırıldığında LPS + CBD 10

mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarındaki TOS düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 1B).

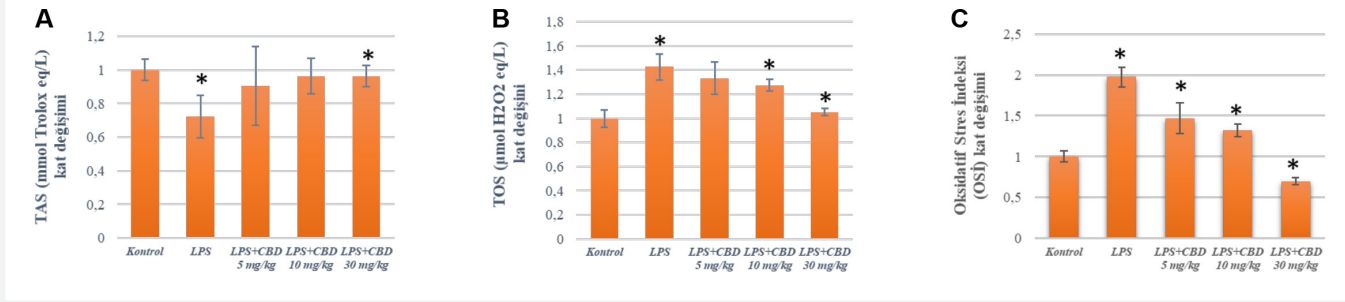
OSİ değerleri açısından incelendiğinde LPS uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla OSİ düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil 1C). LPS grubu ile LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg grupları karşılaştırıldığında OSİ düzeylerinin CBD'nin artan dozu ile ters orantılı olarak istatistiksel olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 1C). Sonuçlarımız CBD tedavisinin gebelikte LPS ile indüklenen sistemik enflamasyon modelinde fetal beyin dokularındaki oksidatif stres parametrelerini azalttığını gösterdi (Şekil 1A-C).

Maternal Beyin Dokularında Oksidatif Stres Parametrelerinin İncelenmesi

Enflamasyon modelinin maternal beyin dokularında oksidatif stres parametrelerini değerlendirmek amacıyla TAS, TOS ve OSİ düzeylerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Fetal beyin

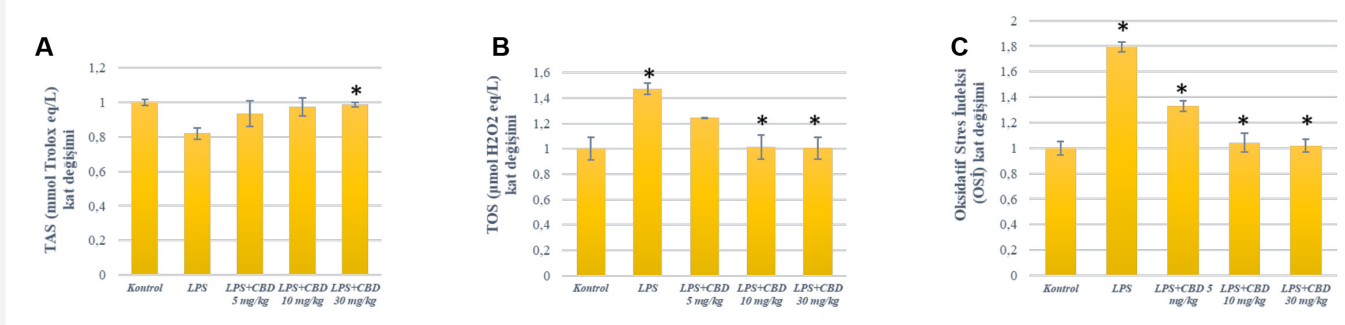
dokularıyla paralel şekilde maternal beyin dokularında, kontrol grubuna kıyasla LPS grubunda TAS düzeylerinde azalma olduğu belirlendi (Şekil 2A). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg gruplarında TAS düzeylerinde, LPS grubuna kıyasla artış olduğu gözlenmesine karşın bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 2A). LPS + CBD 30 mg/kg grubunda LPS grubuna kıyasla TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 2A).

TOS düzeylerinde LPS uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 2B). LPS + CBD 5 mg/kg grubunda LPS grubu ile karşılaştırıldığında TOS düzeylerinde azalma olduğu, ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. LPS grubuna kıyasla, LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarına ait TOS düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 2B).



Şekil 1. Fetal beyin dokularına ait (A) TAS, (B) TOS ve (C) OSİ değerleri. Tek yön ANOVA ve Tukey's çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir

****** $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TAS: Total antioksidan düzeyleri, TOS: Total oksidan düzeyleri, OSİ: Oksidatif stres indeksi, LPS: Lipopolisakkarit, CBD: Kannabidiol, H₂O₂: Hidrojen peroksit



Şekil 2. Maternal beyin dokularına ait (A) TAS, (b) TOS ve (C) OSİ değerleri. Tek yön ANOVA ve Tukey's çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir

****** $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TAS: Total antioksidan düzeyleri, TOS: Total oksidan düzeyleri, OSİ: Oksidatif stres indeksi, LPS: Lipopolisakkarit, CBD: Kannabidiol, H₂O₂: Hidrojen peroksit

OSİ değerlerinde ise LPS uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla OSİ düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 2C). LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarına ait OSİ değerlerinde LPS grubuna kıyasla CBD'nin artan dozu ile ters orantılı şekilde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 2C). Elde edilen sonuçlar, CBD uygulamasının LPS ile indüklenen sistemik enflamasyon modelinde fetal beyin ile paralel şekilde maternal beyin dokularında da oksidatif stres parametrelerini azalttığını gösterdi (Şekil 2A-C).

IL-1 β Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

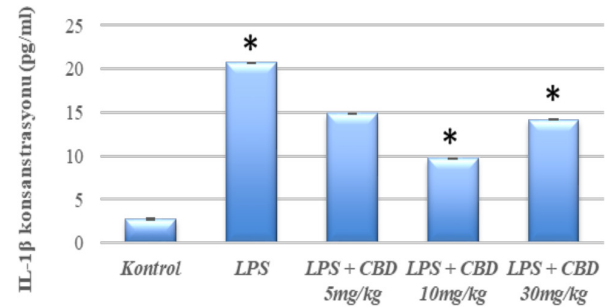
CBD'nin, LPS ile oluşturulan sistemik enflamasyon modelinin maternal beyin dokusu üzerindeki etkisini anlamak amacıyla enflamatuvar süreçlerde arttığı bilinen IL-1 β düzeylerindeki değişimler ELISA ile incelendi. Maternal beyin dokularında LPS uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla IL-1 β düzeylerinde istatistiksel olarak artış olduğu belirlendi. CBD 10 mg/kg ve CBD 30 mg/kg gruplarındaki IL-1 β düzeylerinin LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüğü belirlendi (Şekil 3).

Maternal Beyin ve Fetal Beyin Dokularında Histopatolojik Bulgular

LPS-aracılı gebelikte enflamasyon modelinde enflamasyonun maternal ve fetal doku düzeyinde etkisini incelemek amacıyla, H&E boyama gerçekleştirildi. LPS grubuna ait maternal beyin

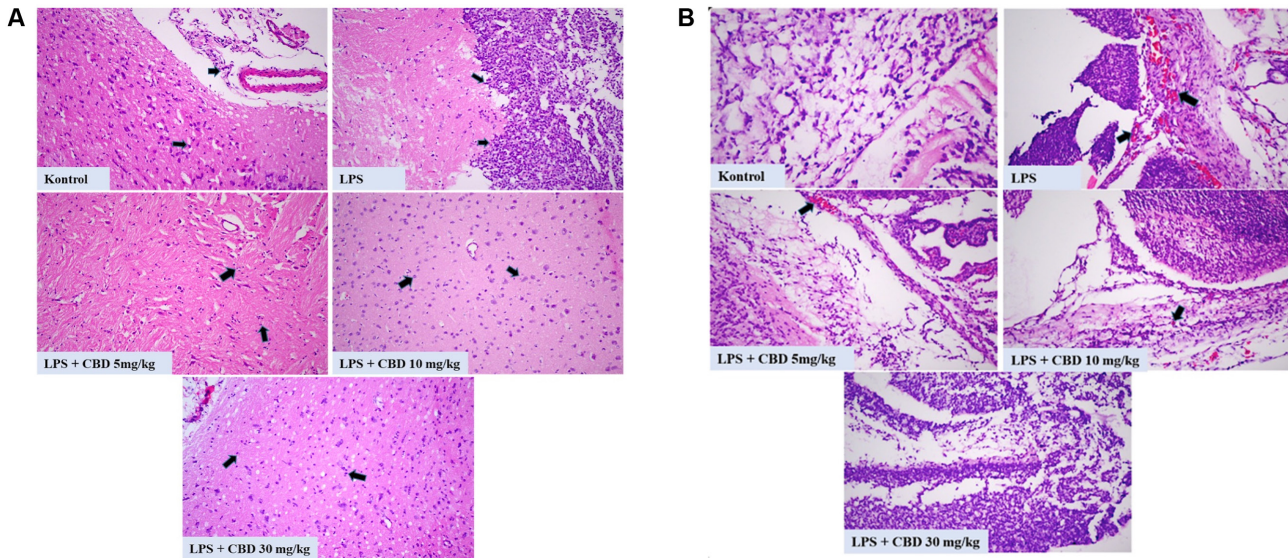
dokularında kontrol grubuna kıyasla yoğun miktarda lenfosit varlığı gözlemlendi. LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında LPS grubuna kıyasla artan dozla ters düzeyde lenfosit düzeylerinde azalma olduğu ve kontrol grubuyla benzer düzeyde lenfosit varlığı izlendi (Şekil 4A).

Fetal beyin dokularına ait örneklerde, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla yoğun miktarda konjesyon gözlemlendi. LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg



Şekil 3. Maternal beyin dokularında IL-1 β konsantrasyonlarının ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. Tek yön ANOVA ve Tukey's çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. LPS: Lipopolisakarit, CBD: Kannabidiol, IL-1 β : İnterlökin-1beta



Şekil 4. A) Maternal beyin dokularına ait Kontrol, LPS, LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg, LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında Hemotoksilen-Eozin boyama ile lenfositler, mikroglial hücreler ve glial hücreler oklarla gösterilmiştir. B) Fetal beyin dokularına ait Kontrol, LPS, LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg, LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında Hemotoksilen-Eozin boyama ile konjesyonun gözlemlendiği, glial hücreler ve meningeal alanlar oklarla gösterilmiştir (H&E, 200X)

LPS: Lipopolisakarit, CBD: Kannabidiol, H&E: Hemotoksilen-eozin

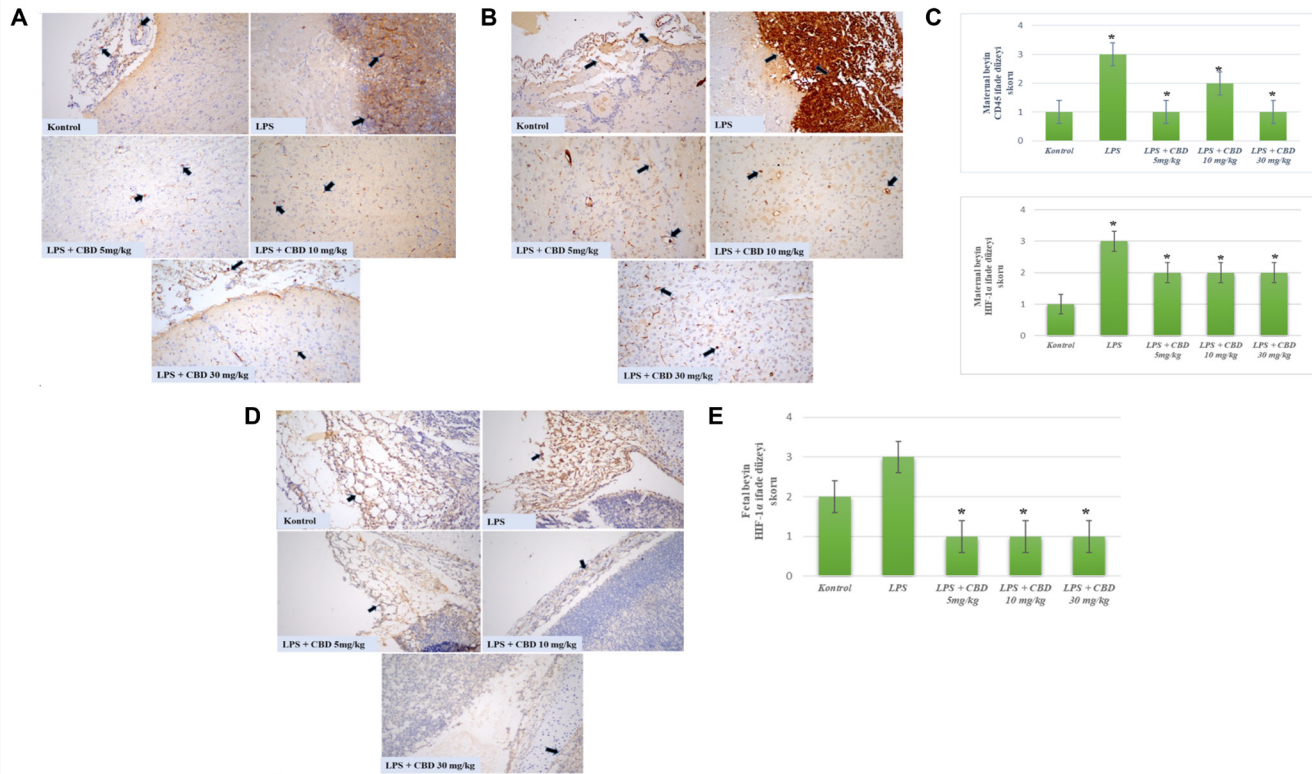
kg gruplarında ise artan dozla ters orantılı şekilde konjesyon bulgularında azalma olduğu belirlendi (Şekil 4B).

Maternal Beyin Dokularında CD45 ve HIF-1 α Düzeylerinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Belirlenmesi

Maternal beyin dokularında enflamasyon aracılı oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla CD45 ve HIF-1 α düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle gerçekleştirildi. LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla CD45 düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5A). Bu bulgular, mikroglial hücre ve lenfosit varlığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde LPS grubunda daha yoğun olduğunu göstermektedir (Şekil 5A). LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında ise LPS grubuna kıyasla CD45 düzeylerinde doz bağımlı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil

5A, 5C). Bu sonuçlar, CBD tedavisinin artan dozla ters orantılı olacak şekilde maternal beyin dokularında mikroglial hücre ve lenfosit varlığını LPS grubuna göre azalttığını göstermektedir (Şekil 5A, 5C).

Hipoksiye yanıtla ilişkili gen ifadesinin önemli düzenleyicisi olan HIF-1 α 'nın enflamasyonda da rol oynadığı bilinmektedir³³. LPS ile indüklenen gebelikte enflamasyon modelinde maternal beyin dokularında HIF-1 α düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle incelendi. Kontrol grubunda da bir miktar mikroglial hücreler, lenfositler ve dokuda (damar endotelinde belirgin) HIF-1 α düzeylerinde artış olmasına karşın, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede mikroglial hücreler, lenfosit ve dokuda HIF-1 α düzeylerinde artış gözlemlendi (Şekil 5B). LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında ise LPS + CBD



Şekil 5. Maternal beyin dokularında Kontrol, LPS, LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg, LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında A) İmmünohistokimyasal yöntem ile lenfosit ve mikroglial hücrelerde CD45 düzeyleri oklarla gösterilmiştir. B) İmmünohistokimyasal yöntem ile lenfosit, mikroglial hücrelerde ve dokuda HIF-1 α ifade düzeyleri oklarla gösterilmiştir (İHK, 200X). C) Maternal beyin CD45 ve HIF-1 α ifade düzeylerine ait skorların istatistiksel olarak değerlendirilmesi. Tek yön ANOVA ve Tukey's çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir

** $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. D) Fetal beyin dokularında Kontrol, LPS, LPS + CBD 5 mg/kg, LPS + CBD 10 mg/kg, LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında meninkslerde ve glial dokularda HIF-1 α ifade düzeyleri belirlendi. HIF-1 α ifadesinin görüldüğü alanlar ok ile gösterilmiştir (İHK, 200X). E) Fetal beyin HIF-1 α ifade düzeylerine ait skorların istatistiksel olarak değerlendirilmesi. Tek yön ANOVA ve Tukey's çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir. ** $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. LPS: Lipopolisakarit, CBD: Kannabidiol, HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktor-1 α

30 mg/kg grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmak üzere LPS grubuna kıyasla HIF-1 α düzeylerinde doz bağımlı azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 5B, 5C). Bu bulgular, LPS ile indüklenen enflamasyonla paralel şekilde oksidatif stresin de CBD tedavisiyle birlikte tersine çevrildiğini göstermiştir (Şekil 5B, 5C).

Fetal Beyin Dokularında HIF-1 α Düzeylerinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Belirlenmesi

Gebelikte oluşturulan enflamasyon modelinde gerçekleşen oksidatif stresin fetal beyin dokuları üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla fetal beyin dokularında HIF-1 α düzeyleri immünohistokimyasal olarak incelendi. Kontrol grubunda meningeal ve glial dokularda az miktarda HIF-1 α düzeylerinde artış gözlemlenmesine karşın, LPS grubunda HIF-1 α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi (Şekil 5D). LPS + CBD 5 mg/kg ve LPS + CBD 10 mg/kg ve LPS + CBD 30 mg/kg gruplarında ise doz bağımlı LPS grubuna kıyasla HIF-1 α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldiği belirlendi (Şekil 5D, 5E). Bu sonuçlar, maternal beyin dokularıyla paralel şekilde fetal beyin dokularında da oksidatif strese bağlı olarak HIF-1 α düzeylerinde artış olduğunu gösterdi (Şekil 5D, 5E).

TARTIŞMA

Kenevir bitkisi tıbbi etkileri nedeniyle uzun süredir birçok araştırmanın odağı olmuştur. Kenevirde elde edilen kannabinoidler fitokannabinoidler olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan THC ve CBD üzerinde en çok çalışılan fitokannabinoidlerdir³⁴. Kenevirde doğal olarak bulunan bileşiklerden biri olan CBD, çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için giderek daha popüler hale gelmiştir³⁵. THC'ye kıyasla psikoaktif etkilerinin bulunmaması ve düşük yan etki profili CBD'nin avantajları arasında yer almaktadır ve güvenilir bir terapötik ajan olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle CBD'nin, akut ve kronik ağrı, anksiyete, nöbet bozuklukları, osteoartrit, migren, uykusuzluk ve kanser gibi durumlarda kullanımı yaygınlaşmıştır³⁶. Bununla birlikte Lennox-Gastaut sendromu ve Dravet sendromu gibi durumlarda CBD içeren ticari preparatlar terapötik olarak kullanılmaktadır^{26,27}. Gebelik sırasında CBD kullanımının güvenilirliğine ilişkin kanıtlar yetersiz olmasına rağmen, CBD; gebe kadınlarda bulantı, uykusuzluk, anksiyete ve kronik ağrı gibi semptomlarda kullanılmaktadır³⁷. Biz de bu çalışma kapsamında, CBD'nin LPS ile indüklenen gebelikte sistemik enflamasyon modelinde fetal nöroenflamasyon aracılı oksidatif stres üzerindeki olası koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık.

PE, 5 yaş altı çocuk ölümlerinin önde gelen nedenidir ve dünya genelindeki doğumların yaklaşık %11'ini oluşturmaktadır³⁸. Erken doğan bebekler, başta serebral palsi olmak üzere solunum ve gastrointestinal bozukluklar gibi bir dizi sağlık komplikasyonu

riski altındadır^{39,40}. PE'nin; enfeksiyon veya enflamasyon, uteroplasental iskemi veya kanama, stres ve immünojenik olarak aracılık edilen diğer süreçler dahil olmak üzere birden fazla mekanizma tarafından tetiklenebilen bir sendrom olduğu düşünülmektedir^{39,41}. PE'ye neden olan risk faktörlerinin çoğu sistemik enflamasyonun artmasına neden olduğundan, PE'nin altında yatan mekanizmalarda enfeksiyon ve enflamasyonun artan uyarımının birden fazla risk faktörü ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur⁴². Bununla birlikte, uterusu enflamatuvar mediyatörlerin varlığı, özellikle fetal akciğerleri ve beyni etkileyen fetal hasar ile ilişkilendirilmiştir^{43,44}. Histopatoloji bulgularımız, LPS uygulamasıyla beraber maternal beyin dokularında yoğun miktarda lenfosit varlığında artış olduğunu göstermiştir (Şekil 4A). Fetal beyin dokularında da benzer şekilde enflamasyona bağlı olarak LPS grubunda yoğun miktarda konjesyon gözlemlenmesi enflamasyon sürecinin fetal ve maternal beyin dokularını olumsuz şekilde etkilediğini göstermektedir (Şekil 4B). CBD uygulamasıyla ise doz-bağımlı maternal beyin lenfosit düzeylerinde ve fetal beyin konjesyon bulgularında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4A, 4B).

IL-1 sitokinleri; IL-1 α , IL-1 β ve IL-1Ra'nın immün sistemin düzenlenmesi ve enflamasyon gibi süreçlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir⁴⁵. Onbir üyeden oluşan IL-1 ailesinde yer alan IL-1 β , otoinflamatuvar hastalıklar olarak bilinen ve insidansları giderek artan sistemik ve lokal enflamatuvar durumlar için terapötik hedef olarak yer almıştır⁴⁶. Gebelikte sistemik enflamasyon modelinin maternal beyin dokusu üzerindeki etkisini anlamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz serolojik ölçümlerimiz, LPS uygulamasıyla artan IL-1 β düzeylerinin CBD uygulamalarıyla doz bağımlı olarak azaldığını göstermiştir (Şekil 3).

CD45 tüm lökositlerde ifade edilen 180-220 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran glikoproteini ve protein tirozin fosfatazdır. Ayrıca CD45'in hücre yüzey antijenlerinin yaklaşık %10'unu oluşturduğu bilinmektedir^{47,48}. CD45'in immün sistemin düzenlenmesinde görev aldığına dair kanıtlar giderek artmaktadır⁴⁹. Sistemik enflamasyon durumunda maternal enflamatuvar yanıtın maternal beyin üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz immünohistokimyasal çalışmalar, LPS grubuna ait maternal beyin dokularına ait mikroglial hücre ve lenfositlerde CD45 düzeylerinde meydana gelen artışın, CBD uygulamasıyla doz-bağımlı şekilde tersine çevrildiğini göstermektedir (Şekil 5A, 5C).

Hipoksi, metabolik olarak aktif organlara ait hücrelerde oksijen eksikliği ve adenosin trifosfat üretiminde artışın olduğu bir durum olarak bilinmektedir. Hipoksi durumunda, biyolojik sistemin oksijen tüketimini karşılanamamaktadır⁵⁰ ve bu durum hücresel işlevleri bozarak normal homeostazın devamlılığını engelleyebilir^{50,51}. Oksijen eksikliği veya hipoksi, oksidatif strese ve HIF ve ROS oluşumuna neden olur. HIF, hücrenin hipoksiye

verdiği fizyolojik yanıtlarda rol oynayan transkripsiyon faktörüdür⁵² ve HIF aracılı sinyal mekanizmaları; hücre sağkalım, sinyalizasyon, migrasyon, anaerobik metabolizma ve vazodilatasyon gibi önemli süreçlerde rol oynamaktadır⁵³⁻⁵⁵. HIF, üç α alt birimden herhangi birinden ve bir β alt birimden oluşan heterodimerdir⁵⁶. HIF-1 α 'nın, oksijen homeostazının ana düzenleyicisi olduğu ve oksijen homeostazında rol oynayan genlerin transkripsiyonunu etkilediği bilinmektedir⁵⁷. Preklinik ve klinik çalışmalar, maternal oksidatif stres ve immün aktivasyonun fetal nörogelişimsel süreç üzerinde olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, HIF-1'in beyin gelişimi, nörogenez ve nöroproteksiyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁵⁸⁻⁶⁰. Nörodejeneratif hastalıklar ve travmatik beyin hasarı gibi patolojik durumlarda ise anormal HIF-1 aktivasyonu görülmüştür^{60,61}. Kletkiewicz ve ark.⁶² yapmış oldukları çalışmada CBD'nin antioksidan aktivitesi nedeniyle hipoksi kaynaklı oksidatif stresi azalttığını raporlamıştır.

Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada CBD'nin maternal ve fetal beyinde gerçekleşen enflamasyon kaynaklı oluşan oksidatif stres üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla oksidatif stres parametreleri ve immünohistokimyasal yöntemle fetal ve maternal beyin HIF-1 α düzeyleri incelendi. Fetal beyin ve maternal beyin dokularında, CBD tedavisiyle birlikte LPS grubuna kıyasla TAS düzeylerinde doz bağımlı artış olduğu belirlendi (Şekil 1A, Şekil 2A), buna karşın TOS düzeylerinde ise LPS grubuna kıyasla CBD'nin artan dozlarıyla ters orantılı şekilde azalma meydana geldiği belirlendi (Şekil 1B, Şekil 2B). İmmünohistokimyasal değerlendirmeler sonucu, CBD'nin fetal ve maternal beyin dokularında doz bağımlı şekilde LPS grubuna kıyasla HIF-1 α düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 5B,D). Elden edilen sonuçlar, CBD'nin LPS ile indüklenen enflamasyon modelinde, enflamasyonla tetiklenen oksidatif stres parametrelerini fetal beyin ve maternal beyin dokularında tersine çevirdiğini göstermektedir. Ayrıca maternal dokularda, LPS grubunda arttığı gözlemlenen HIF-1 α düzeylerinin, CBD uygulamasına bağlı olarak azalması, CBD'nin nöroenflamasyona bağlı olarak gerçekleştiği düşünülen oksidatif stres üzerinde koruyucu etkisi olabileceğini düşündürdü.

Çalışma Kısıtlılıkları

Çalışmamızın temel sınırlılığı, gebelikteki enflamasyonda CBD uygulamasının koruyucu rollerinin mekanizmasının daha kesin olarak anlaşılması için daha kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmasıdır.

SONUÇ

Toplu olarak sonuçlarımız, Cannabis'in en önemli bileşenlerinden biri olan CBD'nin gebelikte sistemik enflamasyona bağlı olarak gelişen fetal ve maternal beyin oksidatif stres üzerinde koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışmadaki tüm hayvan bakımı ve deneysel prosedürler, Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin hayvan araştırmaları yönergelerine uygun olarak yürütülmüş ve Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Komitesi tarafından onaylanmıştır (karar no: 209, tarih: 21.09.2023).

Hasta Onayı: Hayvan deneyidir.

Teşekkür

Hatice Kübra Doğan'a deneysel prosedürdeki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Dipnot

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: D.Ç., Konsept: Y.E., Dizayn: Y.E., Veri Toplama veya İşleme: D.Ç., Y.E., O.E., S.S., Analiz veya Yorumlama: D.Ç., Y.E., O.E., S.S., Literatür Arama: D.Ç., Y.E., O.E., Yazan: D.Ç., Y.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmanın finansal desteği Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2021-8396) tarafından sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. 2013;10(Suppl 1):2.
2. Markopoulou P, Papanikolaou E, Analytis A, Zoumakis E, Siahianidou T. Preterm birth as a risk factor for metabolic syndrome and cardiovascular disease in adult life: a systematic review and meta-analysis. *J Pediatr*. 2019;210:69-80.
3. Arpino C, Compagnone E, Montanaro ML, Cacciatore D, De Luca A, Cerulli A, et al. Preterm birth and neurodevelopmental outcome: a review. *Childs Nerv Syst*. 2010;26:1139-49.
4. Goedicke-Fritz S, Härtel C, Krasteva-Christ G, Kopp MV, Meyer S, Zemlin M. Preterm birth affects the risk of developing immune-mediated diseases. *Front Immunol*. 2017;8:1266.
5. Zhang G, Feenstra B, Bacelis J, Liu X, Muglia LM, Juodakis J, et al. Genetic associations with gestational duration and spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2017;377:1156-67.
6. Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol*. 2017;41: 387-91.
7. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345:760-5.
8. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006;11:317-26.
9. Cappelletti M, Della Bella S, Ferrazzi E, Mavilio D, Divanovic S. Inflammation and preterm birth. *J Leukoc Biol*. 2016;99:67-78.
10. Deshmukh H, Way SS. Immunological basis for recurrent fetal loss and pregnancy complications. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:185-210.

11. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* 2013;19:548-56.
12. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25:1822-32.
13. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1221:80-7.
14. Rogers MS, Wang CC, Tam WH, Li CY, Chu KO, Chu CY. Oxidative stress in midpregnancy as a predictor of gestational hypertension and pre-eclampsia. *BJOG.* 2006;113:1053-9.
15. Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol.* 2014;5:372.
16. Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, et al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond).* 2016;130:409-19.
17. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59:459-69.
18. Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Knight M, Linton EA, Dhir S, et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105:1195-9.
19. Jenkins C, Wilson R, Roberts J, Miller H, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxid Redox Signal.* 2000;2:623-8.
20. D'Souza V, Rani A, Patil V, Pisal H, Randhir K, Mehendale S, et al. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia. *Clin Exp Hypertens.* 2016;38:225-32.
21. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol.* 2009;587:3453-8.
22. Ozen M, Xie H, Shin N, Al Yousif G, Clemens J, McLane MW, et al. Magnesium sulfate inhibits inflammation through P2X7 receptors in human umbilical vein endothelial cells. *Pediatr Res.* 2020;87:463-71.
23. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update.* 2014;20:293-307.
24. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011;36:78-86.
25. van Gool JD, Hirche H, Lax H, De Schaepprijver L. Folic acid and primary prevention of neural tube defects: A review. *Reprod Toxicol.* 2018;80:73-84.
26. Downer EJ. Cannabinoids and innate immunity: taking a toll on neuroinflammation. *Scientific World Journal.* 2011;11:855-65.
27. Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, et al. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One.* 2011;6:e28668.
28. Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Lab Invest.* 2018;98:844-55.
29. Sivrice ME, Yasan H, Kumbul YÇ, Ertunç O, Sayın S. The importance of prostate-specific membrane antigen expression in salivary gland tumors. *Turk Arch Otorhinolaryngol.* 2022;60:206-11.
30. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103-11.
31. Koc S, Aksoy N, Bilinc H, Duygu F, Uysal İÖ, Ekinci A. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with chronic adenotonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75:1364-7.
32. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
33. Rahane D, Dhingra T, Chalavady G, Datta A, Ghosh B, Rana N, et al. Hypoxia and its effect on the cellular system. *Cell Biochem Funct.* 2024;42:e3940.
34. Wray L, Stott C, Jones N, Wright S. Cannabidiol does not convert to Δ 9-Tetrahydrocannabinol in an in vivo animal model. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2:282-7.
35. Corroon J, Kight R. Regulatory status of cannabidiol in the united states: a perspective. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018;3:190-4.
36. Corroon J, Phillips JA. A cross-sectional study of cannabidiol users. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018;3:152-61.
37. Sarrafpour S, Urits I, Powell J, Nguyen D, Callan J, Orhurhu V, et al. Considerations and implications of cannabidiol use during pregnancy. *Curr Pain Headache Rep.* 2020;24:38.
38. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21:74-9.
39. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371:75-84.
40. Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M; EPICure Study Group. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med.* 2005;352:9-19.
41. Romero R, Mazor M, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer DM. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;734:414-29.
42. Goldenberg RL, Culhane JF. Prepregnancy health status and the risk of preterm delivery. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005;159:89-90.
43. Kramer BW, Kramer S, Ikegami M, Jobe AH. Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intra-amniotic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:452-9.
44. Elovitz MA, Brown AG, Breen K, Anton L, Maubert M, Burd I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29:663-71.
45. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:217-25.
46. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
47. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett.* 2018;196:22-32.
48. Woodford-Thomas T, Thomas ML. The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells. *Semin Cell Biol.* 1993;4:409-18.
49. Donovan JA, Koretzky GA. CD45 and the immune response. *J Am Soc Nephrol.* 1993;4:976-85.
50. Span PN, Bussink J. Biology of hypoxia. *Semin Nucl Med.* 2015;45:101-9.
51. Bhutta BS, Alghoula F, Berim I. Hypoxia. *statpearls. treasure island (FL): StatPearls Publishing; 2024.*
52. Kiang JG, Tsen KT. Biology of hypoxia. *Chin J Physiol.* 2006;49:223-33.
53. Chun Y-S, Kim M-S, Park J-W. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α . *J Korean Med Sci.* 2002;17: 581-8.
54. Kumar H, Choi DK. Hypoxia Inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:584758.
55. Graham AM, Presnell JS. Hypoxia inducible factor (HIF) transcription factor family expansion, diversification, divergence and selection in eukaryotes. *PLoS One.* 2017;12:e0179545.
56. Yfantis A, Mylonis I, Chachami G, Nikolaidis M, Amoutzias GD, Paraskeva E, Simos G. Transcriptional response to hypoxia: the role of HIF-1-associated co-regulators. *Cells.* 2023;12:798.
57. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80:51-60.
58. Kleszka K, Leu T, Quinting T, Jastrow H, Pechlivanis S, Fandrey J, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α is crucial for proper brain development. *Sci Rep.* 2020;10:19146.

59. Li G, Zhao M, Cheng X, Zhao T, Feng Z, Zhao Y, et al. FG-4592 improves depressive-like behaviors through HIF-1-mediated neurogenesis and synapse plasticity in rats. *Neurotherapeutics*. 2020;17:664-75.
60. Mitroshina EV, Savyuk MO, Ponimaskin E, Vedunova MV. Hypoxia-inducible factor (HIF) in ischemic stroke and neurodegenerative disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:703084.
61. Fang Y, Lu J, Wang X, Wu H, Mei S, Zheng J, et al. HIF-1 α Mediates TRAIL-induced neuronal apoptosis via regulating DcR1 expression following traumatic brain injury. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:192.
62. Kletkiewicz H, Wojciechowski MS, Rogalska J. Cannabidiol effectively prevents oxidative stress and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in an animal model of global hypoxia. *Sci Rep*. 2024;14:15952.