



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**İNTRAPERİTONEAL LİPOPOLİSAKKARİT
UYGULANAN GEBE RATLARDA,
İMMÜNGLOBULİN TEDAVİSİNİN FETAL BEYİNDE
GELİŞEN İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ashı İNCİ

Antalya, 2011



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

İNTRAPERİTONEAL LİPOPOLİSAKKARİT UYGULANAN GEBE RATLARDA, İMMÜNGLOBULİN TEDAVİSİNİN FETAL BEYİNDE GELİŞEN İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aslı İNCİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nihal OYGÜR

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2011

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2010.04.0103.007)

TEŐEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tüm değerli hocalarıma,

Tezimin tüm aŐamalarında ve asistanlık eğitimim süresinde her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nihal OYGÜR'e,

Tezimin yapımında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. O. Nidai ÖZEŐ'e, Biyolog Duygu ŐAHİNTÜRK ÜNAL'a, Doç. Dr. Nuray ERİN ve ekibine,

Prof. Dr. Uğur YAVUZER'e,

Deney Hayvanları Ünitesi çalıŐanlarına,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım kliniğimizden uzmanlığını almıŐ ve halen çalıŐmakta olan tüm uzman doktor arkadaşlarıma,

Birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve hemŐire arkadaşlarıma,

Her zaman desteğini ve sevgisini esirgemeyen, bana her konuda destek olan aileme, eŐime ve yaŐam enerjim biricik oğluma sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller ve Resimler Dizini	vii
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koryoamniyonit Ve Santral Sinir Sistemi	3
2.1.1. Koryoamniyonit ve preterm doğum	3
2.1.2. Koryoamniyonit ve sitokinler	6
2.1.3. Koryoamniyonit ve fetal inflamatuvar cevap sendromu	8
2.1.4. Fetal inflamatuvar cevap sendromunun santral sinir sistemine etkileri	11
2.1.5. Proinflamatuvar sitokinler ve santral hasarlanma	14
2.1.6. Kaspazlar ve santral hasarlanma	16
2.1.7. Eksitoksisite ve santral hasarlanma	17
2.1.8. Diğer mediatörler ve santral hasarlanma	17
2.2. Fetal Beyin Hasarının Önlenmesi	18
2.2.1. Antibiyotik ve tokolitik ajanlar	19
2.2.2. Antenatal steroid uygulananımı	19
2.2.3. Nörotrofik faktörler	19
2.2.4. Diğer tedaviler	20
2.3. İntravenöz İmmünglobulin	21
2.3.1. Tanım	21
2.3.2. İVİG'in etki mekanizmaları	21
2.3.3. İVİG'in immün düzenleyici etkileri	22
2.3.4. Klinikte kullanımı	24

3. DENEKLER VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.2. Çalışma Protokolü	26
3.3. Çalışma Yöntemi	29
3.3.1. Western Blot yöntemi	29
3.3.2. Kolorimetrik yöntem	29
3.4. Kullanılan Biyoistatistiksel Yöntem	29
4. BULGULAR	30
4.1. TNF- α Düzeyleri	31
4.1.1. 4. saat gruplarının karşılaştırılması	31
4.1.2. 24. saat gruplarının karşılaştırılması	31
4.2. IL-1 β Düzeyleri	32
4.2.1. 4. saat gruplarının karşılaştırılması	32
4.2.2. 24. saat gruplarının karşılaştırılması	33
4.3. Kaspaz 3 Aktivitesi	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	46
7. ÖZET	48
8. ABSTRACT	50
9. KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR DİZİNİ

ANCA	Antinötrofilik sitoplazmik antikor
Apaf 1	Apopitoz proteaz aktivasyon faktör 1
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
BPD	Bronkopulmoner displazi
CP	Serebral palsy
EMR	Erken membran rüptürü
ET-1	Endotelin 1
FIRS	Fetal inflamatuvar yanıt sendromu
G-CSF	Granülosit-koloni uyarıcı faktör
GFAP	Gliyal fibriler astrotik protein
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimulan factor
IFN-γ	İnterferon gamma
Ig	İmmünglobulinler
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin- 6
IVK	İntraventriküler kanama
İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit
İVİG	İntravenöz immünglobulin
LPS	Lipopolisakkarit
MCP	Monosit kemoatraktan protein
NEK	Nekrotizan enterokolit
NGF	Sinir büyüme faktörü
NK	Naturel killer hücreler
NO	Nitrik oksit
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PGE2	Prostaglandin E2
PVDF	Polivinildin diflorid
PVL	Periventriküler lökomalazi

RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sulfat-poliakr jel elektroforez
SF	%0.9 NaCl solüsyonu
SLE	Sistemik lupus eritematozus
STAT	Sinyal transdüser ve transkriptör aktivator
TGF-β	Transforming büyüme faktör β
TLR-4	Toll-like reseptör -4
TNF-α	Tümör nekrozis alfa
βAPP	β -Amyloid prekürsör protein



ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>	
2.1.	Bakteriyel enfeksiyonun uterusu ulaşma yolları	4
2.2.	FIRS'ın organ sistemleri üzerine etkileri	10
2.3.	Mikrogliaların hasar mekanizması	18
3.1.	Çalışma protokol şeması	28
4.1.	4.saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması	34
4.2.	24.saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması	34
4.3.	4. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması	35
4.4.	24. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması	35
4.5.	IL-1 β 'nın 4. saatte Western Blot yöntemi ile görüntüsü	36

Resim

4.1.	24 saatlik gruplardan rastgele birer örnek alınarak yapılan immünohistokimya ve tünel boyalı kesitler	37
------	---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İVİG tedavisinin etkili olduğu hastalıklar	25
4.1. Yavru ratların kiloları	30
4.2. 4. saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması	31
4.3. 24. saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması	32
4.4. 4. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması	32
4.5. 24. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması	33
4.6. 24. saat gruplarında kaspaz aktivitesinin karşılaştırılması	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Preterm doğumun önde gelen ve önemli nedenlerinden biri intrauterin infeksiyonlardır. Maternal infeksiyon bakteriler tarafından oluşturulmakta, mikrobiyal invazyona yanıt olarak fetal inflamatuvar cevap gelişmektedir (1,2). Preterm doğum eyleminin başladığı gestasyon yaşı ne kadar küçükse, amniyotik sıvı kültürü pozitifliği o kadar fazladır. Mikrobiyal invazyona bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar cevap, ya multiorgan disfonksiyonu ve intrauterin ölüm ile sonuçlanmakta ya da postnatal dönemde bronkopulmoner displazi (BPD), intraventriküler kanama (İVK), periventriküler lökomalazi (PVL), nekrotizan enterokolit (NEK), sepsis, pnömoni gibi morbiditelere neden olmaktadır (2).

Periventriküler lökomalazi, prematüritenin sık görülen ve önemli komplikasyonlarından biridir. PVL, özellikle prematürlerde görülen ve ventrikül çevresindeki beyaz cevherin perinatal iskemi veya infeksiyon / inflamasyon sonucu hasarlanması olarak kabul edilmektedir (3). Hasarlanma en fazla, bu bölgede yoğun olarak bulunan preoligodendrositlerde görülmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, maternal infeksiyona fetal inflamatuvar yanıt olarak santral sinir sisteminde interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekrozis alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin yükseldiği ve gelişen inflamatuvar yanıtın preoligodendrositlerin apoptozisi ile sonuçlandığı saptanmıştır (4-8). TNF- α , IL-6 ve IL-1 β 'nin fetal beyinde artmış olduğu, endotoksinin intraamniyotik, intraserebral, intravajinal uygulandığı ve deneysel koryoamniyonit oluşturulan değişik sıçan modellerinde de gösterilmiştir (5-8). Ayrıca maternal lipopolisakkarit uygulanarak infeksiyon oluşturulan başka bir rat modelinde, preoligodendrositlerin apoptozisi; beyaz cevherde artmış kaspaz-3 aktivasyonu ile desteklenmiştir (9). Ancak Chai ve ark. (10) bu kaskatta önemli rolü olan sitokinlerin bizzat fetus tarafından yapılmadığı, hasarlanmanın yüksek düzeydeki maternal sitokinlerin fetal beyine geçişi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

PVL ve inflamasyon arasındaki sıkı ilişki gözönüne alınarak PVL gelişimini önlemek amacıyla subklinik koryoamniyonitte infeksiyona neden olan mikroorganizmaya yönelik antibiyotik kullanımı ile hem prematüritenin hem de PVL'nin önemli ölçüde engellenebildiği düşünülmektedir (11). Ancak erken doğum eylemi öncesi PVL'yi önlemek için antibiyotik kullanımı ile ilgili kontrollü çalışmaların olmaması nedeniyle, bu düşüncüyü destekleyecek yeterli veri yoktur (12,13).

Poliklonal immünglobulin; in vitro ve in vivo şartlarda, hem sitokin üretimini düzenleyerek hem de IL-1 yanıtının baskılanmasını sağlayarak bağışıklık sistemini düzenleyici etki göstermektedir (14,15). Bunların yanısıra immünglobulinin; IL-1, IL-6 ile interferon alfa, beta ve gamma'ya yönelik antikorlar içerdiği de bilinmektedir (15,16,17). B hücre farklılaşmasının CD8 aracılı baskılanması veya sitotoksik T hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi, C3 aktivasyonunun ve kompleman aracılı inflamasyonun azaltılması da immünglobulinin diğer immünmodülatuvar etkileri arasındadır (10,18). Patofizyolojisinde inflamatuvar süreçlerin dahil olduğu Guillian-Barre, Kawasaki, inme, demiyelizan nöropati gibi bazı hastalıklarda poliklonal immünglobulinin tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (10,19,20).

Literatürde inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda kullanılan intravenöz immünglobulinin (İVİG) beyinde deneysel olarak geliştirilen inflamasyon ve PVL gelişimi üzerine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın amacı intraperitoneal lipopolisakkaritle koryoamniyonit oluşturulan gebe sıçanlarda yüksek doz poliklonal immünglobulin uygulayarak immünglobulinin, fetal beyinde gelişen inflamasyon ve apoptozis üzerine olan etkilerini, sitokinler (IL-1 β ve TNF- α) ve kaspaz 3 düzeyinde araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koryoamniyonit Ve Santral Sinir Sistemi

2.1.1. Koryoamniyonit ve preterm doğum

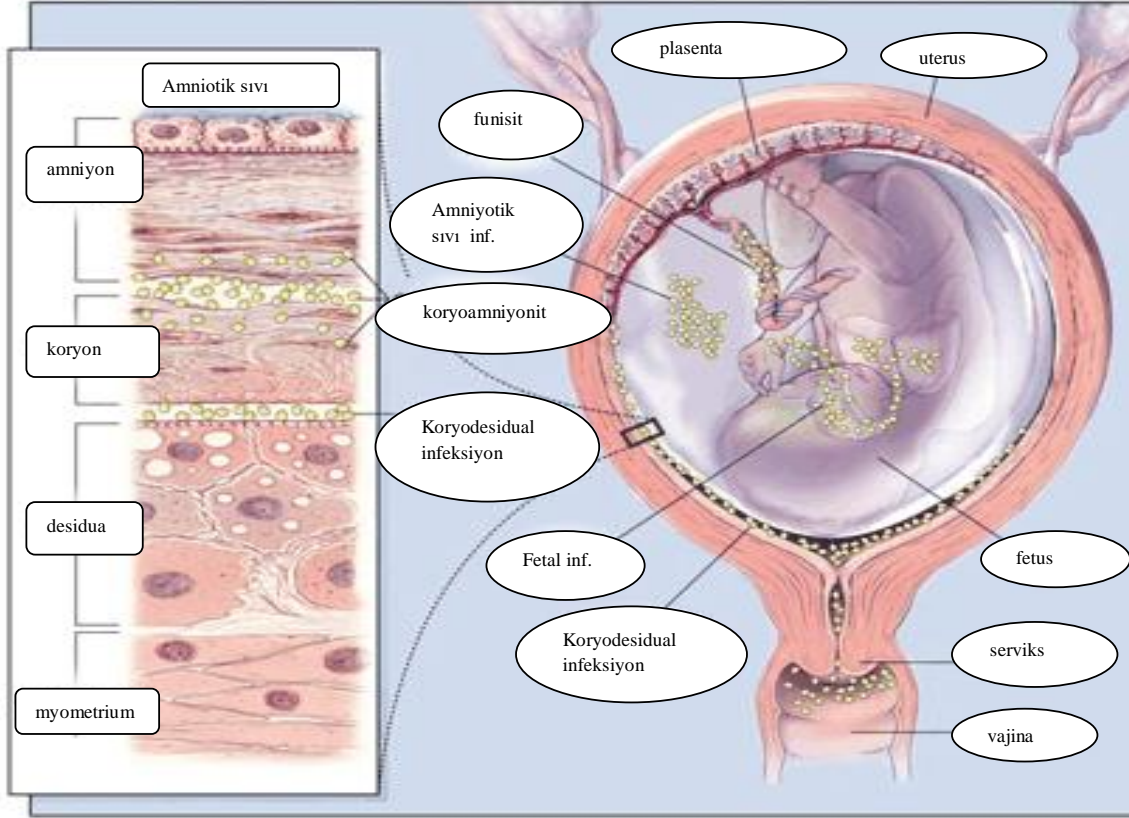
Preterm doğum hızının tüm dünyada artması nedeniyle prematürite ilk bir yaşta görülen ölümlerin önemli nedenlerinden biri haline gelmiştir (21). İnfeksiyon ve preterm doğum arasındaki ilişki, 34-36 haftalarda doğanlarda nadir iken 30 haftadan küçük doğumlarda; amniyotik sıvı histolojik incelemesiyle kanıtlanarak çoğu olguda gösterilmiştir (22). 28. gestasyon haftasından önce doğan ve 1000'den fazla yenidoğanı içeren çok merkezli çalışmalardan elde edilen verilere göre erken preterm doğumların çoğunun nedeni, hem plasental ve umbilikal kord damar inflamasyonu hem de plasental dokunun mikrobiyal inflamasyonu gibi görünmektedir (23,24). Son mikrobiyolojik bilgilere göre her 4 preterm doğumdan biri intrauterin bakteriyel enfeksiyona bağlı gelişmektedir. Histolojik koryoamniyonitin hangi ırkta daha sık olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte, Afrikan Amerikalılarda da preterm doğumların daha fazla olmasına bağlı olarak bu toplumlarda arttığı bildirilmektedir (25).

Sistemik maternal enfeksiyon, preterm eylem ve preterm doğumla yakından ilişkilidir (26). Normal vajinal florayı oluşturan *Lactobacillus* türleri yerine *G. vaginalis*, *Bacteroides* türleri, *Mobiluncus* türleri, *U. urealyticum*, ve *M. Hominise* artışı ile karakterize bakteriyel vajinozisli kadınlarda spontan prematür doğum riski iki kat daha yüksektir (27,28). Asemptomatik genital enfeksiyonların da erken doğumun gerçekleşmesinde önemli bir faktör olduğu görüşü üzerinde durulmaktadır (29). Koryoamniyonit ile ilişkili patojen düşük virulanslı olup, genellikle subklinik seyretmektedir. Preterm doğum yapan kadınlarda koryoamniyonite ait klinik bulgu olmaksızın yapılan amniyosentezde %20 oranında patolojik bakteri izole edilmiştir. Bu hastalarda klinik bulgu ve enfeksiyon kanıtı olmadan bazı inflamatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiş ve bu sitokin üretiminin, preterm doğumu tetiklediği düşünülmüştür. İntraamniyotik IL-6 konsantrasyonunun pozitif amniyotik sıvı kültürüne göre daha değerli olduğu tanımlanmıştır. Bu sonuç intrauterin inflamasyonun, enfeksiyon olmadan da gelişebileceğini göstermektedir (30).

Mikroorganizmaların amniyotik kavite ve fetüse ulaşması için yollar:

1- Vajina ve serviksten yukarıya doğru ilerleme,

- 2- Plasentaya hematojen yayılım (transplasental infeksiyon),
- 3- Retrograd yolla fallop tüplerinden peritoneal yayılım,
- 4- Yapılan invaziv girişimlerdir (Şekil 2.1) (26,31).



Şekil 2.1. Bakteriye infeksiyonun uterusu ulaşma yolları.

Preterm doğum yapan kadınların amniyotik sıvısında en çok izole edilen mikroorganizmalar *Ureoplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* ve *Fusobacterium* türleridir. Amniyotik sıvıda bulunan diğer organizmalar *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus viridans* ve *Bacteroides spp.*, nadiren *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoea* ve *Peptococcus spp.* türleridir. *Haemophilus influenzae*, *Capnocytophaga spp.*, *Stomatococcus spp.* ve *Clostridium spp.* çok nadir izole edilmektedir (26,31).

Son zamanlarda ureoplasma infeksiyonu ile preterm doğum arasında yakın bir ilişki tanımlanmıştır. Anneden bebeğe vertikal geçiş yapmaktadır. Aynı zamanda bu bakterinin, postpartum endometrit, koryoamniyonit, spontan abortuslar, pnömoni, BPD gelişimi ile ilişkisi saptanmış ve ölü doğumlara da neden olduğu gösterilmiştir (32).

Cinsel yolla bulaşan bir infeksiyon olan *Chlamydia trachomatis* ise fetusa vertikal yolla geçerek %5-15 olguda pnömoni ve %15-25 olguda oftalmia neonatoruma yol açmaktadır (31). Servisit vakalarının önemli bir kısmını oluşturmakta ve amniyon sıvısından izole edilmektedir. *Chlamydia trachomatis*'in konjenital pnömoni yaptığına dair vakaların rapor edilmesi, bu mikroorganizmanın da intraamniyotik infeksiyon yapabilme kapasitesi olduğunu göstermektedir ancak, standart kültürlerde üretilmemesi nedeniyle intraamniyotik infeksiyon konusundaki bilgiler net değildir (31).

Virüslerin subklinik ve klinik koryoamniyonit olgularındaki etiyolojileri de tam olarak aydınlatılamamıştır (26,31).

Bakterilerin koryodesidual alana invazyonu sonucu birtakım endotoksinler ve egzotoksinler açığa çıkarak; fetal membranlardan sitokinlerin ve aktif inflamatuvar mediatörlerin salınımını uyarmaktadırlar. Bu sitokin ve mediatörler; TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve trombosit aktive edici faktör (PAF), granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF), reaktif oksijen radikalleri, lökotrienler ve nitrik oksittir (NO). Sitokinler, endotoksinler ve egzotoksinler, uterus kontraksiyonlarını arttıran prostoglandin sentezini ve salınımını uyarmakta, nötrofillerin o bölgeye göçünü sağlamakta, infiltrasyon ve aktivasyonunu başlatmaktadırlar. Matriks metalloproteinazların salınımı ile koryoamniyotik membran hasarı ve rüptürü gerçekleşmektedir. Normal durumlarda amniyon sıvısındaki prostaglandinlerin inaktivasyonundan sorumlu olan prostaglandin dehidrogenaz enzimidir. Kronik infeksiyonlarda bu enzimin aktivitesi azalmakta buna bağlı olarak myometriumdaki prostoglandinlerin düzeyi yükselmektedir. Sonuçta myometrial kontraksiyonlar artmaktadır. Ayrıca enfekte fetus da, fetal hipotalamik ve plasental kortikotropin releasing hormon (CRH) aracılığı ile fetal kortikotropin sentezini ve bu yolla fetal prostaglandin sentezini artırmakta ve bu durum enfekte fetusun kendisinin de doğum eylemine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Özetle enfekte fetustan sitokin salınımı da erken doğum eylemine neden olmaktadır (22,29,31).

Term bebeğin fizyolojik doğumunda artmış intraamniyotik proinflamatuvar sitokin seviyelerinin saptanması, normal doğumda da inflamasyonun kritik role sahip olduğunu vurgulamaktadır (33).

2.1.2. Koryoamniyonit ve sitokinler

Sitokinler etkilerini lokal ve sistemik olarak göstermektedirler. Lokal etkileri temel olarak endotel üzerinde gerçekleşmekte ve burada endotel hücre aktivasyonunu, lökositlerin endotele yapışmasını, endotel-lökosit etkileşimi sonrası lökositlerin inflamasyon bölgesine göçünü sağlamaktadırlar. Göç eden lökositler bu bölgede aktive olarak inflamasyonu; hücrede solunumsal patlama, fagositoz, degranülasyon ile sınırlandırmaya çalışmaktadırlar. Sitokinlerin diğerk lokal etkileri ise serbest oksijen radikallerinin salınımı, sitokin sentezini yeniden aktive etme ve endojen mediatör salınımıdır. Sistemik etkilerini ateş, naturel killer (NK) aktivasyonu, T hücrelerinin çoğalması, sitotoksik T hücre artışı ve B hücre aktivasyonu şeklinde göstermektedirler (34).

Sitokinler:

1. Proinflamatuvar sitokinler: IL-1, IL-6, IL-8, IL-5, TNF- α , interferon gamma (IFN- γ).
Nonspesifik immünite ve inflamasyonu artırmaktadırlar.
2. Spesifik immünite: IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16.
Lenfosit aktivasyonundan sorumludurlar. Lenfositlerin büyümesini ve farklılaşmasını sağlamaktadırlar.
3. IL-10 (Sitokin sentez inhibitör faktör), Transforming büyüme faktör β (TGF $-\beta$).
Düzenleyici rol oynamaktadırlar.
4. Kemokinler: IL-8, Monosit kemoatraktan protein (MCP) 1, 2, 3, Eotaksin, Makrofaj inflamatuvar proteinler (MIP-1a, MIP -1b)
5. G-CSF ve granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör (GM-CSF). Kemik iliğı öncüllerini uyarmaktadırlar.

Proinflamatuvar sitokinler içinde TNF- α ve IL-1, sitokin kaskatında diğerklerinden daha önemli role sahiptirler.

2.1.2.a. IL-1

IL-1, aktive monosit ve makrofajlardan bakteriler ve bakteriyel ürünlere yanıt olarak salınmaktadır. İnflamasyonun erken yanıtında önemli rolü vardır. IL-1 üretimi hem translasyon hem de transkripsiyon seviyelerinde düzenlenmektedir. IL-1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere 2 alt tipi mevcuttur. İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda, diğerk sitokinlerin ve kendi kendisinin salınımında rol oynamaktadır (21).

IL 1'in fonksiyonları;

- Önemli bir immünmodülatördür.
- İnflamatuvar hücre aktivasyonunu sağlamaktadır.
- NK hücrelerini aktive etmektedir.
- T ve B hücrelerinin proliferasyonunu sağlamaktadır (21, 22).

Normal bir gebelikte IL-1, desidua ve plasental membranlardan salgılanmaktadır. IL-1 seviyesi erken gebelikte, hamile olmayan kadınlardan belirgin olarak yüksek bulunmakta, ikinci trimesterde ölçülemeyecek seviyeye inmekte ve 3. trimesterde üretimi tekrar başlamaktadır (23). İnfeksiyon varlığında gelişen preterm doğumlarda ise IL-1'in amniyotik sıvıdaki konsantrasyonu, infeksiyonu olmayan preterm doğumlara kıyasla oldukça yüksek saptanmakta ve infeksiyonlu amniyotik sıvıdaki artmış IL-1 aktivitesinin büyük çoğunluğunu IL-1 β oluşturmaktadır (24). İmmünohistokimyasal analizler ve insitu hibridizasyon teknikleri, histolojik olarak gösterilen ve klinik özellikleri taşıyan koryoamniyotitli hastaların koryon ve desidua örneklerinde IL-1 β mRNA ekspresyonunu göstermekte ve hücresel düzeyde koryoamniyotitte en belirgin IL-1 üretimi infiltrate makrofajlardan olmaktadır (21). IL-1 β 'nın bu dokulardaki esas kaynakları çoğunlukla makrofajlar iken nötrofiller ve desidual hücreler de üretimde rol almaktadır (25).

2.1.2.b. TNF- α

TNF- α , IL-1 ile benzer özellikler göstermekte, aktive makrofajlar ve diğer hücrelerden salınmaktadır. TNF- α 'nın desidua hücrelerinde ve TNF- α reseptörlerinin de plasental hücrelerde gösterilmiş olması TNF- α 'nın gestasyonda sitokin üretiminde anahtar role sahip olduğunu desteklemektedir (26). Normal gebelikte; TNF- α , ikinci ve üçüncü trimestere kadar amniyon sıvısında saptanamamakta, intraamniyotik infeksiyon ve infeksiyona bağlı erken doğumda ise amniyon sıvısındaki miktarında belirgin artış olmaktadır (21). TNF- α aynı zamanda önemli bir immünmodülatördür. B lenfositlerinden IL-2 salınımını ve sitolitik T lenfositlerinin üretimini artırarak Class-2 MHC antijen ekspresyonunu sağlamaktadır. Kan beyin bariyerinde, trombojenik ve vasküler değişikliklerde de önemli rol oynayarak bariyerin geçirgenliğini artırmakta ve pial arterlerde vazokonstriksiyona neden olmaktadır. IL-1 ile etkileşerek vasküler endotelde prokoagulan aktiviteyi, prostasiklin sentezini, plasminojen aktivatör inhibitör ekspresyonunu indüklemekte, prokoagulan aktivitesi ile iskemik hasar yaratmaktadır (27). Ayrıca lökositlerin endotele adezyonunda etkilidir. Kılcallar üzerinde direkt toksik etkisi

de vardır. Kan beyin bariyerinin geçirgenliğini artırarak matriks metalloproteinazların (jelatinaz B) üretimine neden olmakta miyelin ve oligodendrositlere zarar vererek astrositik proliferasyonu artırmaktadır. Sonuç olarak demiyelinizasyon ve reaktif gliozis ile beyin ciddi zarar görmektedir.

İntrauterin infeksiyona yanıt olarak üretilen TNF- α ,IL-1 hem preterm doğuma hemde neonatal morbiditelere neden olmaktadır. Bakteriyel ürünlere yanıt olarak desidua hücrelerinden üretilen IL-1 ve TNF- α koryodesiduit oluşturarak uterin kontraksiyonları dolaylı olarak artırmaktadır. Erken doğum eylemi, IL-1 ve TNF- α 'nın sinerjistik etkisine ek olarak intrauterin dokulardan prostaglandin üretimi ile ilişkilidir. IL-1 ve TNF- α , amniyon hücreleri, koryonik hücreler ve desidua hücrelerden prostaglandin E2 (PGE2) ve F2- α sentezini uyarmaktadır. IL-1 β aynı zamanda sitozolik fosfolipaz A2'nin sitozolden membran translokasyonunu hızlandırmakta ve bakteriyel endotoksinlerle birlikte (LPS) 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenazın fetal membranlarda aktivitesini baskılayarak prostaglandinlerin in situ yıkımını engellenmektedir (30). Sitokinler fetomaternal yüzeyde prostaglandin reseptörlerinin ekspresyonunu da etkilemektedir. IL-1 β , PGE2'nin reseptörü olan ve amniyon kökenli hücrelerde PGE2 üretimini hızlandıran EP1 reseptörlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. IL-1 ve TNF- α aynı zamanda PAF asetil-hidrolazın salınımını (PAF'ı inaktive eder) baskılayarak artmış PAF aktivitesine neden olmakta, PAF ise doğumdan önce koryon-desidua hücrelerinden PGE2 üretimini uyarmaktadır (22).

2.1.3. Koryoamniyonit ve fetal inflamatuvar cevap sendromu

İntrauterin infeksiyon ve/veya inflamasyon erken membran rüptürünün (EMR) vepreterm doğum eyleminin en önemli nedenidir. İntrauterin infeksiyonu olan vakaların %80'i erken doğumla sonuçlanmaktadır (35). Uterustaki bakteriyel infeksiyonlar, maternal dokular ve fetal membranlar arasında (koryodesidua alan), fetal membranlarda (amniyon ve koryon), plasentada, amniyotik sıvıda, umbilikal kordonda ya da fetusta oluşabilmektedir.

Koryoamniyonit; ya fetal-maternal (koryodesidua boşluk) yada fetal kaynaklı dokuların (koryoamniyotik membran, amniyotik sıvı ve umbilikal kord) intrauterin inflamasyon durumunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir (36). Histolojik koryoamniyonit ise, pekçok vakada steril dokuların patojenle invazyonunun gösterilmesi esasına dayanmaktadır (37). Bunlar, histolojik bulguların (polimorfonükleer hücre

infiltrasyonu) yanısıra mikrobiyolojik (pozitif kültür/patojenler için polimeraz zincir reaksiyonu) ve biyokimyasal (artmış intraamniyotik sitokinler) koryoamniyoniti de içine alan kriterlerdir.

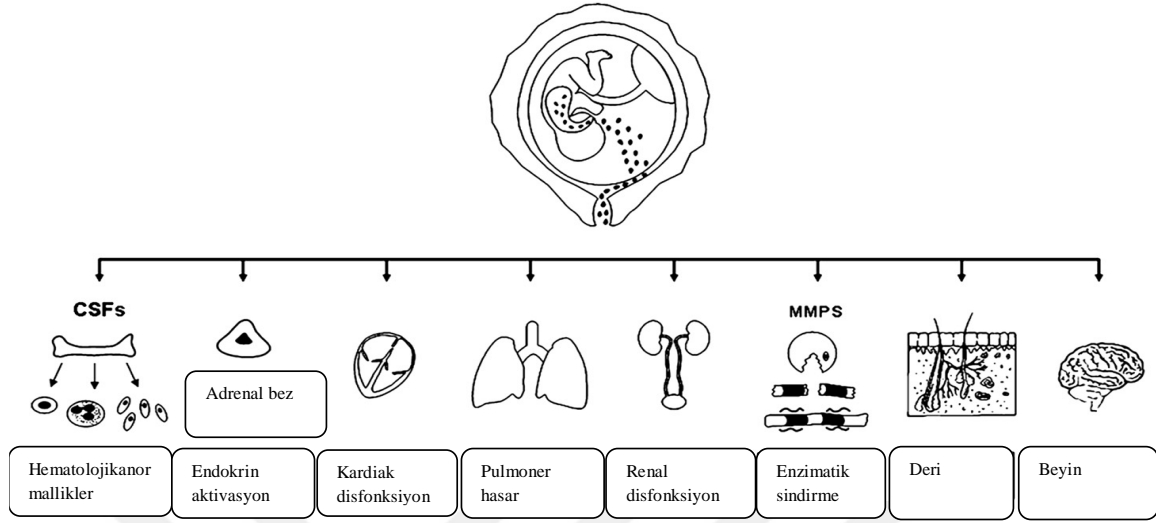
İnfeksiyona yatkınlığı arttırdığı gösterilen bazı faktörler vardır. Bunların hepsinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. A ve 0 kan grubuna sahip olmak, gebelikte obez olmak, gebeliğin 2. trimesterinde servikal yetmezlik nedeniyle takip edilmiş olmak koryoamniyonit için yüksek risk taşımaktadır (38).

Koryoamniyonit insidansına dair tam bir veri yoktur, ancak terme doğru insidans azalmakta ve preterm doğum, sosyoekonomik durum, etnik farklılıklar insidansı etkilemektedir. Beyaz ırkta, siyah ırka göre risk daha azdır. Erkek bebek, 35 yaşından büyük olmak, sigara ve/veya alkol kullanımı, anemi, işsizlik, idrar yolları infeksiyonu ve bakteriyel vajinozis koryoamniyonit riskini artıran faktörlerdir (38).

Fetal vaskülit; koryon (koryonik vaskülit) ve umbilikal kordonun (funisit-umbilikal vaskülit) damar duvarlarında nötrofillerin varlığı olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizma veya ürünlerinin fetusa ulaşması, sitokin salınışına ve sistemik fetal inflamatuvar cevaba neden olmakta, fetusta ortaya çıkan sistemik inflamatuvar cevap, “fetal inflamatuvar yanıt sendromu (FIRS)” olarak adlandırılmaktadır. İnflamatuvar cevap aslında infeksiyon ya da hasara karşı koruyucu bir mekanizma olarak gelişmektedir. Bu inflamatuvar cevap; proinflamatuvar sitokinler ve inflamasyon bölgesinde monosit ve makrofajlar tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı glikoproteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IFN γ , TNF- α) etkili inflamasyonun esas savaşçılarıdır (akut faz yanıtını oluştururlar). Antiinflamatuvar sitokinler ise başlayan inflamatuvar sürecin düzenlenmesini ve vital organlarda hemostazı sağlamakla görevlidirler (31).

Fetal vaskülit, fetal inflamatuvar yanıtın en önemli komponentlerinden biridir ve burada maternal lökositler intervillöz aralıktan koryonik yüzeye, buradan da amniyon ve amniyotik sıvıya geçerek umbilikal korda invaze olmaktadır. FIRS, sublinik bir durumdur ve EMR olmadan yada EMR varlığında fetal plazma IL-6 seviyesinin 11 pg/ml’in üzerinde bulunması olarak tanımlanmaktadır (2,31,39-41). FIRS’in histolojik değerlendirilmesinde umbilikal kordonda inflamasyonun (funisit) ve kronik vaskülitin gösterilmesi altın standarttır. Funisit endotelial hasarla ilişkilidir ve organ tahribatının gelişmesinde anahtar rol oynamaktadır. Fetal inflamatuvar yanıtın indirekt göstergesi ise fetal kaynaklı olan amniyon sıvısındaki beyaz küre sayısıdır (34).

FIRS tanımlanan fetusun en sık morbidite ve mortalite nedenleri, özellikle pretermlerde RDS, sepsis, pnömoni, BPD, IVK, PVL ve NEK'dir (34, 42) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. FIRS'in organ sistemleri üzerine etkileri.

İnflamatuvar yanıtı sağlayan sitokinlerin aşırı salınımı zarar vericidir. Şok, multiorgan yetmezliği ve ölüme neden olabilirler (34). Amniyotik sıvı ve fetus dolaşımında proinflamatuvar sitokinlerin artışı ve fetal vaskülit varlığı; PVL, BPD, fetal sepsis, ve fetal kardiyak disfonksiyon gibi çok sayıda fetal ve neonatal sekel gelişimi ile ilişkilidir. Son zamanlarda fetal inflamatuvar cevabın; preterm doğum, beyaz cevher hasarı, serebral palsi (CP) ve kognitif problemlerle olan ilişkisinin, maternal inflamatuvar yanıttan çok daha önemli olduğu anlaşılmaya başlanmıştır (43).

Maternal inflamatuvar yanıtın gelişimi önemli olmakla birlikte, intraamniyotik sitokinlerin fetal orijinli olduğu yönündeki veriler ağırlıktadır. Fetal sitokin düzeyleri, fetal vaskülit gelişimi ve amniyon sıvısının inflamasyonunun şiddeti maternal serum düzeyleri ile ilişkili gözükmemektedir. Bu veriler de, fetal inflamatuvar cevabın, pretermlerde gelişebilecek sonuçlara katkısının daha önemli olduğunu göstermektedir (44).

2.1.4. Fetal inflamatuvar cevap sendromunun santral sinir sistemine etkileri

İnfeksiyon/inflamasyona fetal maruziyet, fetal beyin gelişimine hasar veren uzamış nöroinflamatuvar cevap ile sonuçlanmaktadır. FIRS'da beyin hasarının derecesi, hasarın oluşum zamanı ile yakından ilişkilidir. Gelişmekte olan beyinde esas hücre popülasyonunu preoligodendrositler oluşturmaktadır. Oligodendrosit öncülleri olan

preoligodendrositler mitotik olarak aktif hücreler iken, immatür oligodendrositler postmitotik hücrelerdir. Preoligodendrositlerin hasarı ile miyelinizasyonda azalma, beyaz cevher hasarı, PVL ve sonuçta serebral palsi gelişmektedir. 30 gestasyon haftasından önce doğan prematür infantlar ile yapılan bir kohort çalışmasında, doğumdan kısa süre sonra (ortalama 2 gün) kranial görüntüleme alınmış, yaklaşık yarısında uzun dönemde geliştiği düşünülen beyin anormallikleri saptanmıştır. Bu çalışma, antenatal infeksiyon / inflamasyon ile fetal inflamatuvar cevabın fetal hasar ve/veya beyin gelişiminde problemler ile sonuçlandığını desteklemektedir (45). PVL'nin ise daha çok iskemik hasara bağlı geliştiği düşünülmeye rağmen son çalışmalarda infeksiyonun PVL gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (46). Yavru kedilere endotoksin uygulanması sonrası beyinlerinde PVL benzeri değişiklikler olduğu gözlenmiştir (47).

Mikroglial hücreler lipopolisakkarit reseptörü olarak bilinen toll-like reseptör-4'e (TLR-4) sahip nöronal olmayan tek hücre grubudur ve LPS'nin indüklediği oligodendrosit ölümü ile giden nörodejenerasyondan sorumludur (48,49). Mikroglialların aktivasyonu nöroinflamatuvar cevap sendromunda; intraselüler ısı şok protein sinyalini içeren TLR bağımlı yolağı aktive etmekte, eksitoksisite, inflamatuvar ve serbest radikal hasarı üzerinden, gelişmekte olan beyne hasar vermektedir (50,51). Mikrogliallar aynı zamanda bizzat sitokin de salgılayarak beyin hasarını arttırmaktadır. Neonatal ratlara intraserebral LPS verilerek yapılan bir deneysel hayvan modelinde mikroglialların aktivasyonunda ve TNF- α seviyelerinde belirgin artma olduğu gösterilmiştir (52).

İnfeksiyonun başlattığı inflamasyonla ortaya çıkan FIRS'da beyin hasarının oluşması birkaç basamakta gerçekleşmektedir.

Bu mekanizmalar:

2.1.4.a. LPS'nin tanınması

Lipopolisakkaritin tanınmasında ilk basamak, LPS'nin LPS bağlayıcı proteine bağlanmasıdır. Akut faz reaktanı olan LPS bağlayıcı protein, karaciğerden sistemik dolaşıma salınmakta ve LPS'nin; CD14, TLR-4 ile ekstrasellüler adapte edici protein MD2'den oluşan lipopolisakkarit reseptör kompleksine bağlanmasını sağlamaktadır. LPS reseptörü ekstrasellüler lösenden zengin tekrarlar içermekte ve tek transmembran bölge ile intraselüler Toll/interlökin-1 reseptör bölgesinden oluşmaktadır. Deneysel kanıtlar LPS'nin asıl transmembran reseptörünün TLR-4 olduğunu göstermekte ve TLR-4 geninde oluşan mutasyonlarda LPS, reseptöre bağlanamamaktadır (53,54). Ayrıca MD-2 lipopolisakkarit cevabı için gerekli olup, TLR-4 aracılığıyla mitojenin aktive ettiği protein aktivasyonunu içeren intraselüler olaylar dizgesini başlatmaktadır. MD-2'den yoksun farelerde LPS'ye yanıt oluşmadığı gösterilmiştir (53,54). TLR-4 sinyali, nükleer faktör-kB'nin nükleer translokasyonu ve inflamatuvar genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanmaktadır (55). TLR ve diğer pattern tanıma reseptörleri mikrobiyal patojenler tarafından sunulan molekülleri tanımaktadırlar. TLR'ler tarafından tanınan ve neonatal dönemde patojenik olan organizmalar *grup B Streptokoklar*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans*, *Cytomegalovirüs* ve *Enterobacteriaceae*'lardır (56).

2.1.4.b. Lipopolisakkaritin indüklediği inflamasyonun periferden santral sinir sistemine geçişi

İntakt kan beyin bariyeri, beyin parankimi ile dolaşan molekülleri ayırarak beyin homeostazını sağlamaktadır. Bariyerdeki sıkı kavşaklar gelişmekte olan beyni sarmakta ve küçük molekülleri bile geçirmemektedir (57). Fakat beynin bazı bölgelerinde kan beyin bariyeri yoktur. Bu bölgelerde sistemik dolaşımdaki peptitler, sitokinler, bakteriyel ürünler gibi büyük moleküller santral sinir sisteminin hücrel elemanları ile direkt temasa geçmektedirler (58).

Lipopolisakkaritin indüklediği inflamasyonun periferden santral sinir sistemine geçişini açıklayan 2 mekanizma üzerinde durulmaktadır.

1. mekanizma (İndirekt etki): Kan beyin bariyeri vasküler hücrelere ve proteinlere çok düşük geçirgenlikle karakterize özelleşmiş endotel hücrelerinden oluşmaktadır. Lipopolisakkarit (0.01–10 mg/kg) meninkslerde, ventrikül etrafında ve koroid pleksusta TNF- α ve IL-1 β 'nin mesajcı mRNA sentezini indükleyerek sitokin salınımını artırmakta ve sitokinlere kan beyin bariyerinin geçirgenliğini artırarak hem kendilerinin hemde inflamatuvar mediatörlerin beyne geçişini sağlamaktadır. İn vitro çalışmalarda sitokine (TNF- α , IL-1 β INF- γ) ve LPS'ye maruziyet sonrası kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin plazma vasküler endotelyal büyüme faktörleri aracılığıyla arttığı da gösterilmiştir (59).

2. mekanizma (Direkt etki): Erişkin santral sinir sisteminde LPS reseptörü olan TLR-4, kan beyin bariyerinin olmadığı ventrikül çevresinde, leptomeninkslerde ve koroid pleksustaki hücrelerde bulunmaktadır. LPS direkt olarak bu bölgelerde TLR-4'e bağlanarak inflamatuvar cevabı başlatmakta ve bu inflamasyon, santral sinir sistemindeki mikroglial hücrelere doğru yayılmaktadır. İnflamatuvar cevabın yayılmasında en önemli rol TNF- α 'ya aittir (60,61). LPS'nin TLR-4 reseptörüne bağlanmasıyla nükleer faktör kB aracılı kaskat da devreye girmekte, parakrin etkiyle sitokinler ve kemokinler aracılığıyla beyinde inflamatuvar sinyal giderek genişlemektedir (62). TLR-4, LPS'nin indüklediği nöronal dejenerasyon için gereklidir.

Lipopolisakkarit plasentayı geçip beyne ulaştığında hem lokal, hem de sistemik etki göstermektedir. Lipopolisakkaritin sistemik cevabı daha çok hipotalamik-hipofiz-adrenal aks üzerinden gerçekleşmekte, hepatik akut faz protein sistemi de sistemik cevaba katılmaktadır. Oluşan sistemik cevap sonrası inflamatuvar kaskat başlamakta, transkripsiyon faktörleri salınmakta preterm doğum ve fetal inflamatuvar hasar ortaya çıkmaktadır (63-65).

2.1.4.c. Lipopolisakkarit tarafından oluşturulan santral immün cevap

Lipopolisakkarit beyinde santral immün cevabı indüklediğinde periferde de benzer etki görülmektedir. LPS'nin intraserebral veya intraperitoneal enjeksiyonu santral sinir sisteminde sinyal transdüser ve transkriptör aktivatör (STAT) 3'ün fosforilasyonuna neden olmaktadır. Lipopolisakkaritin beyne etkisi oldukça karmaşık olup sistemik immün endokrin etkilerle yakın ilişkilidir (66).

Fetusta özellikle serebral beyaz cevherin, gebeliğin ortalarında sistemik LPS maruziyetine daha duyarlı olduğu deneysel modellerde gösterilmiştir (67,68). Benzer şekilde gebe ratların uterus hornlarına gebeliğin sonlarında E. Coli inokülasyonu yapılmış ve yaşayan fetuslarda beyaz cevher hasarı olduğu saptanmıştır. Gebeliğin erken evrelerinde maternal LPS'ye maruziyet, gelişmekte olan fetal beyne özellikle preoligodendrositler üzerinden zarar vermekte, daha geç maruziyet ise mikroglialar üzerinden sitokin üretimini indükleyerek hasar oluşturmaktadır (69).

Chai ve ark (10) embriyogenezin 18. gününde uygulanan yüksek doz LPS'nin fetal beyinde IL-1 β ve TNF- α üretimine neden olduğunu göstermişlerdir.

Sonuç olarak LPS, ya sitokinler gibi inflamatuvar mediatörlerin sistemik salınımına neden olarak hem bu sitokinler aracılığıyla kan beyin bariyerinin geçirgenliğini artırmakta hemde sitokinlerin beyne geçişini sağlamaktadır; yada kan beyin bariyerinin olmadığı bölgelerden direkt olarak hücre reseptörlerine bağlanıp mikrogliaları aktive etmekte ve bu yolla santral sinir sistemi cevabını başlatmaktadır.

Santral inflamasyon esas olarak mikrogliaların aktivasyonu sonucu sitokin ve trofik faktörlerin salınması ile ortaya çıkmaktadır. İmmün cevap kognitif fonksiyonları, dendritik yapıları, katekolamin dengesini, nöral ve gliyal proliferasyonu ve santral sinir sistemi duyarlılığını etkilemekte ve beyin lezyonlarının gelişmesine neden olmaktadır.

2.1.5. Proinflamatuvar sitokinler ve santral hasarlanma

Amniyotik boşluğun mikrobiyal invazyonu prematür infantların yaklaşık %25'inde görülmekte ve konjenital fetal enfeksiyona neden olmaktadır. Mikroorganizmaların veya mikrobiyal ürünlerin fetusa geçişi, mononükleer hücrelerde özellikle TNF- α ve IL-1 gibi sitokin yapımını indüklemektedir. İnflamatuvar kaskatın önemli mediatörleri olan sitokinler ya fetusta oluşan FIRS sonucu sistemik dolaşımda yükselmekte ve kan beyin bariyerindeki geçirgenliği artırarak SSS'ne geçmekte yada kan beyin bariyerinin tam olarak gelişmemiş kısımlarından LPS'nin direkt SSS'ne geçmesi ve mikroglialar

üzerindeki TLR-4 reseptörlerine bağlanması sonucu mikroglialar tarafından yapılmaktadır (70,71). Sitokinler kan beyin bariyerini taşıyıcı aracılı mekanizma ile geçmektedirler. Bu mekanizma oldukça sınırlı kapasitede gerçekleşmekte ve çok çabuk doygunluğa ulaşmaktadır (72). Dolaşımdaki sitokinler ayrıca kan beyin bariyeri ile temasta olan endotel ve diğer hücrelerin luminal kısmındaki reseptörlerine bağlanmakta, kan beyin bariyerinin bazal kısmından salınan prostaglandinler parakrin etkiyle beyin parankimi boyunca inflamatuvar sinyali yaymaktadırlar. Sitokinlerin artışı ile başlayan inflamatuvar süreç, sitokinlerin lökositleri aktive etmesi ve aktif lökositlerin de kan-beyin bariyerinin etkinliğini azaltması ile devam etmektedir. Aktif lökositler daha sonra kan-beyin bariyerini geçerek mikroglia ve astrositleri aktive etmekte, aktifleşen mikroglia ve astrositler ise daha çok sitokin ve kemokin yapmaya başlayarak bir kısır döngü oluşturmaktadırlar. Aktif mikroglialardan salınan sitokinler de preoligodendrosit toksisitesine yol açmaktadır (73). Sitokinler, NO, siklooksijenaz, serbest radikal üretimini ve eksitatör aminoasit salınımını da artırarak beyinde direkt toksik etki yaratmaktadır (74,75). Mekanizmaların hangi oranda beyinde hasar yarattığı ve beyne geçtiği bilinmemekle birlikte kan beyin bariyerinin bozulmuş fonksiyonunda, beyinde lokal hasar oluşmakta ve bu hasar uzun vadede nörodejeneratif hastalıkların da zeminini oluşturmaktadır (76). Gelişmekte olan beyne en ciddi hasarı veren sitokin, permeabiliteyi arttırarak kan-beyin bariyerini kolayca geçen ve serebral oksijenlenmenin azalmasına, intrakraniyal basıncın artmasına, diffüz intravasküler koagülopatiyeye yol açan TNF- α 'dır (77). Ayrıca bu sitokin nöronal doku için kuvvetli bir sitotoksik ajandır ve oligodendrosit öncüllerinin apoptozuna yol açmaktadır. TNF- α , 2 farklı reseptör (TNF- α R1 ve TNF- α R2) üzerinden etki etmektedir. Her ikisi de gliyal veya nöronal hücrelerde eksprese edilmekte ve çözülmüş halde bulunmaktadır. TNF- α 'nın R1'e bağlanması pekçok moleküler kaskadı başlatmakta ve apoptoz ile bağlantılı yolları hızlandırarak, kaspazları ve NF- κ B transkripsiyon faktör yollarını aktive etmektedir.

PVL ile sitokin arasındaki ilişkiyi araştırmak için 17 neonatal PVL'li beyin örneği ile 17 kontrol grubunda sitokinler immünohistokimyasal olarak çalışılmış, PVL'li örneklerin %88'inde ve kontrol grubunun %18'inde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimi artmış bulunmuştur. Sitokinlerin özellikle koagülasyon nekrozunun olduğu hipertrofik astrositlerde ve mikroglial hücrelerde eksprese edildiği saptanmıştır (78). Deneysel modellerde de sitokinlerin intraperitoneal enjeksiyonu ile astrogliazis ve beyaz cevherde ensefalomyelit geliştiği gösterilmiştir (79). Ayrıca bir başka araştırmada beyin omurilik

sıvısında TNF- α , IL-1 γ , IL-6 düzeyleri yüksek saptanan yenidoğanların manyetik rezonansla yapılan beyin görüntülemelerinde serebral lezyonlar olduğu saptanmıştır (80). İnflamasyona bağlı santral hasarlanmada rolü olan ve reseptörü preoligodendrositlerin yüzeyinde yer alan IFN- γ 'nın da hem preoligodendrositlere kültür ortamında direkt olarak toksik etki yaptığı hem de TNF- α 'nın proinflamatuvar etkisini arttırdığı bir başka deneysel modelde gösterilmiştir (81).

Kemokinler bir çeşit sitokin olup aktif immün hücreler tarafından salınmakta, immünmodülatuvar hücrelerin vasküler sistemden hasarlı santral sinir sistemi bölgesine geçmesinde görev almaktadır (82). Deneysel bir sıçan modelinde kemokinlerin özellikle hipoksik-iskemik olaydan sonra enfarktli beyin bölgesine geçişinin, geçici nötrofil saldırısı, mikroglia/makrofaj, CD4 lenfosit, astrosit aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (83).

2.1.6. Kaspazlar ve santral hasarlanma

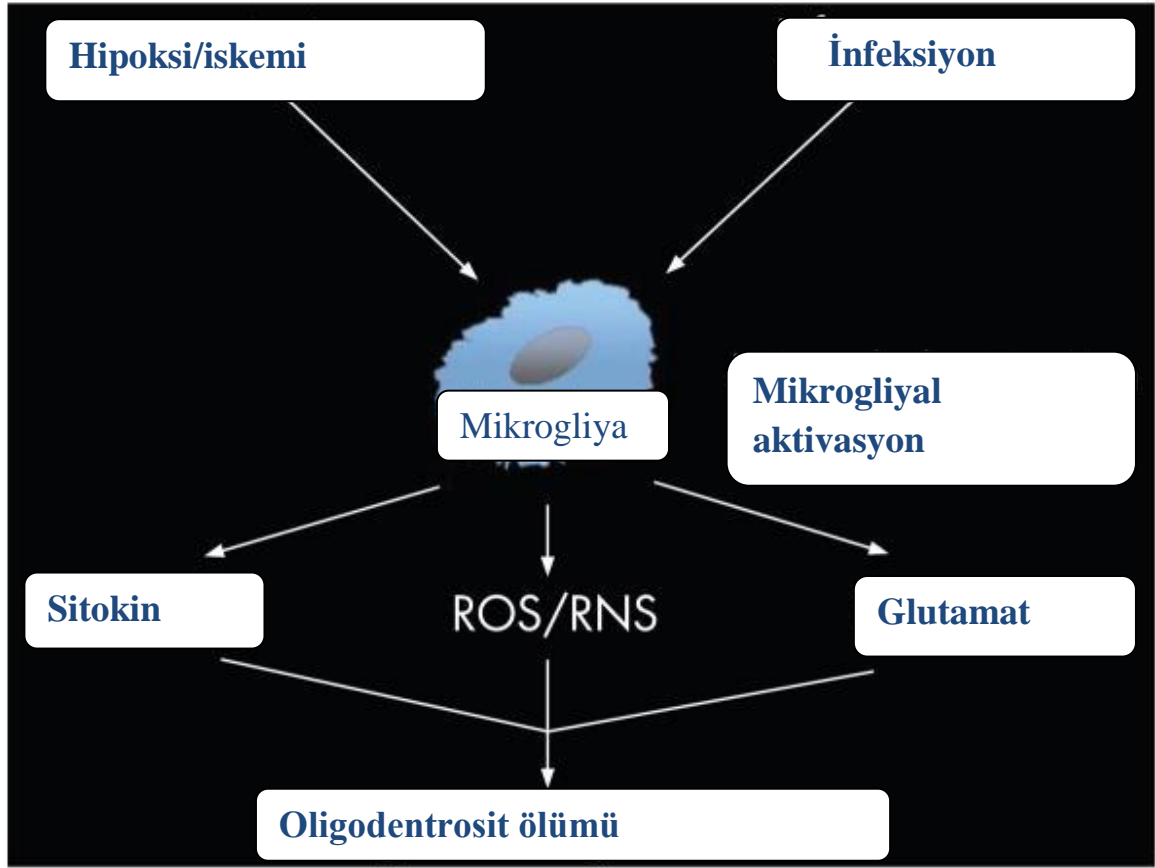
Gelişen beyinde apopitoz (normal fizyolojik durumlarda) prenatal gelişim sırasında gerçekleşmekte, erken postnatal dönemde azalmakta ve erişkin beyinde minimale inmekte; iskemi, infeksiyon/inflamasyon apopitoz olayını tetiklemektedir. İntrinsik yada ekstrinsik uyarı sonrası tetiklenen apopitoz, sistein içeren aspartat-spesifik proteazlar olan kaspazların aktivasyonuna neden olmaktadır. İntrinsik ve ekstrinsik kaspaz kaskadı DNA parçalanmasına, membranların ayrışmasına, membranların şişmesine ve hücre ölümüne yol açmaktadır. İntrinsik kaspaz kaskadı reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) tarafından başlatılarak oksijen tüketimi azaltılmakta ve kaspaz 9 aktive edilmektedir. Bu kaskatta prokaspaz 9, hasarlı mitokondriden salınan sitokrom c ve apopitoz proteaz aktivasyon faktör 1 (Apaf1) apopitozom kompleksini oluşturmaktadır. Apopitozom kompleksi dimerize olduğunda, prokaspaz 9 aktif formuna ayrışmakta ve efektör kaspazları aktive etmektedir. Ayrıca efektör kaspazlar, kaspaz 8 ve 10 tarafından aktive edilebilmektedir. Prokaspaz 8 veya 10 ile ilgili reseptörler ölümü indükleyen sinyal kompleksi ile uyarılmakta ve bu uyarılma prokaspazların aktif formuna ayrışmasına neden olmaktadır. Aktif kaspaz 8 veya 10 daha sonra efektör kaspazı aktive ederek hücre ölümüne yol açmaktadır. Pek çok memeli hayvan türlerinde kaspaz 3; kaspaz 8, 9 ve 10 tarafından aktive edilen efektör kaspazdır. Efektör kaspaz 3; hayvan hipoksi-iskemi ve LPS'nin indüklediği inflamasyon/infeksiyon modellerinde nöronal hücre gövdesinde, striatumda ve hipokampüste gösterilmiştir (9,84).

2.1.7. Eksitoksisite ve santral hasarlanma

Sitokinler eksitatör aminoasit salınımını artırarak beyinde özellikle preoligodendrositlere direkt toksik etki yaratmaktadır. Preoligodendrositler matürasyonlarının tam olmaması nedeniyle eksitoksisiteye oligodendrositlere göre daha duyarlıdır. Eksitoksisite hem glutamat reseptör aracılı olmayan, hem de reseptör aracılı yolakla preoligodendrositlere zarar vermektedir. Reseptör aracılı olmayan mekanizma, sistin taşıyıcısı ile glutamatın yarışması esasına dayanmakta, yüksek ekstraselüler glutamat varlığında sistin dışarı atılmaktadır. Sonuçta biyosentez için sistine ihtiyaç duyan intraselüler glutasyon azalmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (85,86). Reseptör aracılı mekanizma mikromolar seviyede glutamata ihtiyaç duymaktadır.

2.1.8. Diğer mediatörler ve santral hasarlanma

FIRS'de sitokinler dışında adhezyon molekülleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks proteinleri, matriks metalloproteazlar ve diğer biyolojik mediatörler de yer almaktadır. Kan beyin bariyerindeki disfonksiyon sonucu immün hücreler beyne geçmekte, artmış permeabilite ile serebral ödem ve intrakranial hipertansiyon gelişmektedir. Bu değişiklikler ile santral sinir sisteminde inflamasyon gelişmekte ve diğer hücrel moleküler değişiklikler başlamaktadır. Serebral oksijenizasyon düşmekte, kan ve besin desteği azalmakta biyokimyasal ve metabolik düzensizlik başlamaktadır. Bu lokal, hücrel, vasküler ve dokusal değişiklikler başlangıçtaki santral sinir sistemi hasarını artırmakta ve sekonder beyin hasarı geliştirmektedir (87-89).



Şekil 2.3. Mikrogliaların hasar mekanizması.

2.2. Fetal Beyin Hasarının Önlenmesi

Fetal beyin hasarının engellenmesi için asıl yapılması gereken infeksiyonu ve dolayısıyla preterm doğumu engellemektir. Postnatal tedavi daha çok destek tedavisi olup hastanın kliniğine göre değişmektedir. Gerekli hastalara ventilatör desteği sağlanarak karbondioksit basıncına dikkat edilmeli, hipokarbi-hiperoksiden kaçınılmalıdır. Neonatal kan basıncına dikkat edilmeli, serebral kan basıncının düşük oynamalarda etkilenebileceği gözönüne alınarak gerekirse inotrop desteği verilmelidir. Serebrovasküler otonöregülasyon ve beyin elektrofizyolojisinin yatak başı monitorizasyonu ile beyin hasarının erken tanınması mümkün olabilmekte ve zamanında müdahale sağlanabileceği düşünülmektedir (36-46).

Preoligodendrosit hasarına neden olan yolakların, sitokin ve mikroglial reseptör blokajı ile engellenebileceğini gösteren deneysel çalışmalar yapılmış olmakla birlikte klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (90).

2.2.1. Antibiyotik ve tokolitik ajanlar

Özellikle erken membran rüptürü olan gebeliklerde antibiyotik kullanımının koryoamniyoniti engelleyerek hem preterm doğum, hem de neonatal morbiditelerde (neonatal infeksiyonlar, surfaktan eksikliği, oksijen ihtiyacı, anormal kardiyovasküler bulgular) belirgin azalma sağladığı gösterilmiştir (11,91). Antibiyotiklerin doğru seçilmesi zordur. Postnatal NEK riskini de arttırdığı için preterm doğum eylemi olan gebelerde ko-amoksilav kullanımını önerilmemektedir. Eritromisin bakteriden daha az endotoksin salınımına neden olduğu için ko-amoksilava kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Aslında amniyotik kavitenin korunmuş bir alan olması ve antibiyotik girişinin zorluğu nedeniyle gebeye konservatif tedavi uygulaması tartışmalıdır (42). Prematür doğumdan önce antibiyotik kullanımının periventriküler lökomalaziye azalttığı düşünülmektedir ancak, bu düşünce kontrollü çalışmalarla kanıtlanmamıştır (92,93).

2.2.2. Antenatal steroid uygulananımı

Antenatal steroid uygulananımı, neonatal morbidite ve mortalitede belirgin azalma sağlamaktadır. Eksojen steroidlere antenatal maruziyetin, intraventriküler kanama ve beyaz cevher hasarının oluşumunu ve ciddiyetini azalttığı gösterilmiştir (94). Antenatal steroidlerin santral sinir sistemi üzerinde olumlu etkileri ile ilgili öne sürülen mekanizmalar;

1. Sitokinlerin periferde ve beyinde ekspresyonunu düzenlemek,
2. Serebral perfüzyonu düzenlemek,
3. Antioksidan enzimleri aktive etmek,
4. Hücrel farklılaşmayı hızlandırmak ve
5. Sistemik inflamatuvar cevabın etkilerini ve ciddiyetini azaltmak şeklindedir (42).

2.2.3. Nörotrofik faktörler

Nörotrofik faktörler, hücre yaşamını ve programlı hücre ölümünü düzenleyen proteinlerdir. Hipoksi-iskemi ve infeksiyon/inflamasyon oluşturulan hayvan modellerinde nörotrofik faktörlerden beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) nöroprotektif faktörler olarak gösterilmiştir. Endotelin 1 (ET-1) en kuvvetli vazokonstriktör olup, astrositler ve endotel hücreleri gibi pek çok hücrede mitojenik ve antiapoptotik etki göstermektedir. Proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1) infeksiyon /

inflamasyon ve iskemi durumunda endotel hücrelerinden ET-1 üretimini artırmaktadırlar (84).

Hayvan çalışmalarında beyin hasarı ile nörotoksik faktörlerin salınımı arasında direkt ilişki saptanmıştır. Hipotermi, hipoksi-iskemi sonrası neonatal hayvanlarda nöroprotektif etkiye sahiptir. Hipertermi ise yetişkin rat modellerinde beyin hasarını artırmaktadır. Maternal ateş, mikrobiyal enfeksiyona bağlı oluşabileceği gibi nonenfeksiyöz nedenlerle ve epidural anestezi sonucu da gelişebilmektedir. Maternal ateş fetal beyinde hipoksi oluşturarak, oksijen ihtiyacını ve serebral metabolik hızı artırarak beyin hasarına neden olabilmektedir (27).

2.2.4. Diğer tedaviler

İnfeksiyon/inflamasyon veya iskemi/reperfüzyonun tetiklemesi ile başlayan ve oligodendrosit ölümü ile sonuçlanan bu kaskadın değişik basamaklarına etki ederek, hasarlanmayı azaltmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan hipotermi, kalsiyum kanal blokerleri, Mg, adenozin, lamotrijin, fenitoin ile glutamat salınımının engellediği düşünülmektedir.

NMDA ve Non-NMDA reseptör antagonistlerinin (topiromat), glutamat reseptör blokajı yaparak, hipotermi, COX inhibitörleri, indometazin, allopurinol, desferoksaminin serbest radikallerin üretimini bloke ederek ve Vit E, N-asetil sisteinin serbest radikalleri tutarak etki ettiği varsayılmaktadır. Anti-apoptotik ajanlar: nötrofinler, büyüme faktörleri, proapoptotik yolağın spesifik inhibitörleri olup bu inhibitörlerin perinatal dönemdeki santral etkilenmeyi azaltmada olumlu etkileri olduğu kabul edilmektedir. Ancak hipotermi dışındaki bütün uygulamalar deneysel çalışmalar şeklinde olup henüz kontrollü klinik çalışmalarla desteklenmemiştir (95). Benzer şekilde pentoksifilinin (96) ve eritropoetinin (97) antiinflamatuvar yolak üzerinden etki ederek perinatal asfiksi ve hipoksik iskemik ensefalopatiji azalttığı da sadece hayvan modellerinde gösterilmiştir. Deneysel hayvan modellerinde aktive protein C'nin, endotoksinin uyardığı beyin hasarında etkili olduğu saptanmış, ayrıca antiinflamatuvar, anti-trombotik ve fibrinolitik etkisi açısından erişkinde ciddi sepsiste kullanılmış, başarılı sonuçlar alınmış, ancak yenidoğanlar yada çocuklar üzerinde etkili olduğu gösterilmemiştir (42,98). Eksojen IL-1 β ve TNF- α gibi sitokin reseptör antagonistlerinin uygulanması da sadece hayvan modelinde çalışılmıştır (42).

2.3. İntrevenöz İmmünglobulin

2.3.1. Tanım

İmmünglobulinler (Ig), B lenfositler tarafından üretilen hüııoral immün sistemin major etkili molekülleri olup spesifik antijenlerle reaksiyon veren proteinlerdir. İntrevenöz immünglobulin (İVİG) en az 3.000-10.000 ve bazen 100.000 sağlıklı insandan alınan plazma havuzundan elde edilmektedir. Preparatların içeriğinde en fazla bulunan IgG'dir ve birden fazla IgG allotipi (Gm ve Km tipleri) barındırmaktadır. Preparatlarda IgG, insan serumuna en yakın değerdedir, çok az miktarda IgA, IgM ve diğer serum proteinlerini, eser miktarda çözünen CD4, CD8, HLA moleküllerini ve bazı sitokinleri içermektedir. İVİG'de, patojenlere ve yabancı antijenlere karşı etkili immün antikorlardan yüksek oranda mevcuttur. Preparatlar, İVİG'in Fc reseptörleri ile etkileşimini sağlayan intakt Fc molekülleri içerir (14). Çok sayıda İVİG preperatı mevcuttur. Preparatların hepsinin içerdikleri IgG alt grupları aynıdır. HbsAg, HCV ve HIV taşımazlar. Her bir ürünün terapotik farklılığı olmamasına karşın, içeriğindeki Ig A miktarı, glukoz miktarı ve fiyat açısından farklılıkları vardır.

2.3.2. İVİG'in etki mekanizmaları

İVİG'in etki mekanizmaları tam olarak anlaşılammakla birlikte birçok mekanizma üzerinde durulmaktadır. İmmünoglobulinin; hedef hücre yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanarak reseptörün fonksiyonunu düzenlediği ve antijenin hücreye girişini önlediği, B ve T hücrelerinin Fc reseptörlerine bağlanarak antikor yanıtını engellediği ve immünmodülatuvar etki gösterdiği düşünölmektedir. Anti-idiotipik etkisini B hücrelerini baskılayarak, anti-inflamatuvar etkisini ise monosit/makrofajlardan salınan sitokinler ve diğer proinflamatuvar mediyatörlerin yapımını azaltarak göstermektedir. Komplemana kovalent olarak bağlanmakta, aktif durumdaki endotelial hücelere bağlanmasını engellemektedir (20).

2.3.3. İVİG'in immün düzenleyici etkileri

2.3.3.a. Patojenik otoantikörlerin ve otoreaktif B hücre klonlarının nötralizasyonu

İVİG ile otoantikörlerin değişken bölgelerinin etkileşimi, İVİG'in in vivo otoreaktif B hücre klonlarını düzenleme yeteneği olduğunu göstermektedir. Ayrıca, intakt İVİG ile İVİG'in F(ab')₂ fragmanının, bazı otoantikörlerin fonksiyonel aktivitesini nötralize ettiği ve/veya otoantikörlerin, otoantikora özel otoantijene bağlanmasını engellediği in vitro olarak gösterilmiştir (20). İVİG'in otoantikör aktivitesinin inhibisyon yeteneği özellikle; faktör VIII, tiroglobulin, DNA, intrinsik faktör, periferel sinirler, nötrofil sitoplazmik antijen, platelet glikoprotein IIb-IIIa, asetilkolin reseptör, endotel hücreleri, fosfolipidler, nefritik faktör ve retinal otoantijen B'ye karşı otoantikörlerin varlığında gözlenmiştir. Bu mekanizma İVİG'in otoimmün hastalıklardaki etkisini açıklamaktadır (20,99). İVİG, bu otoantikörlerin tespit edildiği sistemik lupus eritematozus (SLE) ve antinötrofilik sitoplazmik antikör (ANCA) aracılı vaskulitlerde bu mekanizma ile etkili olmaktadır (100). Kanlarında faktör VIIIc'ye karşı otoantikör tespit edilen hastalarda İVİG uygulanımı sonrası otoantikör seviyelerinin düşmesi, İVİG'in bu etkiyi F(ab)₂ fragmanları ile bağlanarak gerçekleştirdiğini göstermiştir (101). Hastalığa özgü İVİG'in otoantikörlere karşı anti-idiotip antikörlerinin varlığı; miyasteni gravis, Lambert-Eaton miyastenik sendromu ve antikör aracılı nöropatilerdeki etki mekanizmasını açıklamaktadır (20).

2.3.3.b. Anti-inflamatuvar etkileri

İVİG, akut ve kronik inflamatuvar olaylarda immünmodülatuvar ajan olarak kullanılabilir. İVİG'in anti-inflamatuvar etkisi, esas olarak sitokin ve sitokin antagonistlerinin üretimini düzenlenmesi şeklindedir (102). İVİG, IL-1'in doğal reseptörüne karşı antikör üretimini selektif olarak başlatırken, proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α üretimini etkilememektedir. İVİG'in antiinflamatuvar etkisi, sitokin üretimini düzenleyen monositik sitokinlerle sınırlı olmayıp, İVİG'in T helper ve TH2 sitokin üretimini düzenleme yeteneğine de dayanmaktadır. İVİG aynı zamanda kompleman aracılı hasarı engelleyerek, immün kompleks aracılı inflamasyonu azaltarak, endotel hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ederek, mikrobiyal toksinleri nötralize ederek, steroid ihtiyacını azaltarak antiinflamatuvar etki göstermektedir (20).

2.3.3.c. Kompleman aracılı etkileri

İVİG'in kompleman ile etkileşimi C5b-9 membran atak kompleksinin oluşumunu ve dolayısıyla kompleman aracılı doku hasarını engellemektedir. Aktif kompleman komponentlerini tutmakta ve kompleman atağını hücrel hedeften uzaklaştırmaktadır (103). İVİG içerisindeki Ig molekülleri, aktif C3b ve C4b'ye C1q bağımlı ve C1q bağımlı olmayan yollarla bağlanarak kompleman ürünlerinin hedef yüzeylerde depolanmasını engellemekte, böylelikle C5 konvertaz aktivasyonunu ve membran atak kompleksi oluşumunu önlemektedir. Özellikle dermatomyozitli hastalarda İVİG uygulaması ile C5b-9'un plazma seviyelerinde, C5b-9 antijenlerinin endomiyel kılcallarda depolanmasında ve C3b'nin miktarında belirgin olmak üzere düşme gözlenmiştir (104). İVİG'in, içerisinde çözünmüş halde bulunan kompleman reseptörleri de kompleman komponentlerini bağlayarak bunların damar endoteline tutunmalarını inhibe etmektedirler (105, 106).

2.3.3.d. Fc reseptör aracılı etkileri

İVİG; fagositler üzerindeki Fc γ reseptörlerini satüre ederek, değiştirerek ve afinitesini etkileyerek Fc reseptör blokajı yapmakta, duyarlı hale gelen fagositler fonksiyon göremez hale gelmektedirler.

Guillan Barre sendromu ve kronik inflamatuvar demiyelizan polinöropatide makrofajlar üzerindeki Fc reseptörleri bloke olmakta ve antijenle kaplı hedef hücrenin makrofaj aracılı fagositozu inhibisyona uğramaktadır. Bu hastalıklarda İVİG kullanımı ile, makrofaj aracılı demiyelinizasyon engellenebilmektedir (107).

İdiopatik Trombositopenik Purpura'da (ITP) ise İVİG içerisindeki Ig'ler, fagositik hücrelerin üzerindeki Fc reseptörlerine bağlanmakta, otoantikörlerle duyarlı hale gelmiş olan trombositlerin yıkılımını engellemektedirler. ITP'li hastalara saflaştırılmış Fc fragmanları verilerek yapılan çalışmalar, İVİG ile meydana gelen düzelmelerin Fc reseptör blokajı ile olduğunu ve trombosit sayıları ile serum solubl Fc γ reseptör (sFc γ R) düzeylerinin birbirine paralel olarak arttığını göstermiştir (108). İVİG içerisindeki Ig'nin %95'den fazlası monomerik şekildedir. İVİG infüzyonu ile monomerik Ig'ler dimerik şekle dönmekte ya da hastaların dolaşan antijenleriyle birleşerek immün kompleksleri oluşturmaktadırlar. IgG monomerleri daha çok monositlerin üzerindeki Fc γ RI 'e bağlanırken, polimerik IgG ve immün kompleksler monosit ve nötrofillerin üzerindeki Fc γ RII ve Fc γ RIII'e bağlanmaktadır. Polimerik IgG ile bağlanan monositlerin Fc γ R

ekspresyonu ve fagositik aktiviteleri azalmaktadır (109,110). Sonuç olarak İVİG; ITP ve diğer otoimmün sitopeniler üzerinde, Fc reseptör blokajı ile birlikte FcγR ekspresyonu ve afinitesini düzenleyerek etkili olmaktadır.

2.3.3.e. T ve B lenfositlerin membran molekülleri ile etkileşimi

İVİG, otoreaktivite ve tolerans gelişiminden sorumlu monositler, T ve B hücrelerinin bazı membran molekülleri ile etkileşmektedir. İVİG'in, insan T hücre reseptörleri, CD5, CD4, HLA sınıf I molekülleri, RGD adezyon molekülleri, Fas, sitokin ve sitokin reseptörlerindeki sabit ve değişken bölgelere karşı otoantikor içerdiği gösterilmiştir (20, 111-113). Bu moleküllere karşı gelişen antikorlar İVİG'in immünmodülatuar etkisi için önemlidir. İVİG aynı zamanda değişken miktarda çözünmüş CD4,CD8, HLA I ve II molekülleri içermektedir.

2.3.3.f. Antijen sunan hücrelerle etkileşimi

İVİG'in esas hedefi özelleşmiş antijen sunan hücreler olan dendritik hücrelerdir. İVİG'in, dendritik hücrelerin farklılaşmasını ve matürasyonunu sağladığı, olgun dendritik hücrelerden IL-12 sekresyonunu engellediği, IL-10 üretimini arttırdığı invitro olarak gösterilmiştir (114). İVİG'in içerisinde, IgG dışında, eser miktarda bulunan değişik Ig-izotipleri, membran ürünleri (CD4-CD8) ve bazı HLA belirleyicileri; T hücreler ile antijen sunan hücreler arasındaki etkileşimi farklılaştırarak immün yanıtın şeklini değiştirmektedir (111).

2.3.4. Klinikte kullanımı

Önce yalnızca primer immün yetersizlik hastalıklarında uygulanan İVİG, günümüzde birçok hastalıkta profilaktik ve tedavi edici ajan olarak kullanılabilir. İmmünglobulin ilk defa 1952 yılında Ogdon Bruton tarafından hipogammaglobulinemili bir çocukta uygulanmıştır (115). 1979 yılında antikor eksikliği bulunan hastalarda intravenöz olarak verilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (116).

Çizelge 2.1. İVİG tedavisinin etkili olduğu hastalıklar (14,20).

Primer immün yetersizlik hastalıkları

- X'e bağımlı agammaglobulinemi
- Sık rastlanılan değişken immün yetersizlik (CVID)
- Wiskott- Aldrich sendromu
- Hiper IgM sendromu
- Kombine immün yetersizlik(SCID)
- Selektif antikor eksiklikleri
- IgG alt grup eksiklikleri
- Ataksi-telenjektazi

Sekonder immün yetersizlik hastalıkları

- Kronik lenfositik lösemi
- Multiple miyeloma
- Kemik iliği transplantasyonu

İmmün sebepli hastalıklar

1. Sitopeniler

- Idiopatik trombositopenik pupura
- Kazanılmış immün trombositopeni
- Otoimmün nötropeni
- Otoimmün hemolitik anemi
- Otoimmün eritroblastopeni
- Parvovirus B19 ilişkili eritrosit aplazisi

2. Nöromusküler hastalıklar

- Guillan Barre sendromu
- Miyastenia gravis
- Multiple skleroz
- Demiyelizan nöropati
- Multifokal nöropati

3. Diğer hastalıklar

- Polimiyozit-dermatomiyozit
- Otoimmün hemofili
- Kazanılmış von Willebrand hastalığı
- Kawasaki hastalığı
- ANCA pozitif vaskülitler
- Sistemik lupus eritomatozus
- Antifosfolipid antikor sendromu
- Rekürren spontan abortuslar
- Romatoid artrit ve Felty's sendromu
- Juvenil romatoid artrit
- Tiroid oftalmopatisi
- Birdshot retinokoroidopatisi
- Graft versus host hastalığı
- Steroid bağımlı astım
- Steroid bağımlı ciddi atopik astım
- Crohn hastalığı
- Otoimmün üveit

Viruslerin neden olduğu otoimmün miyokardit

3. DENEKLER VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

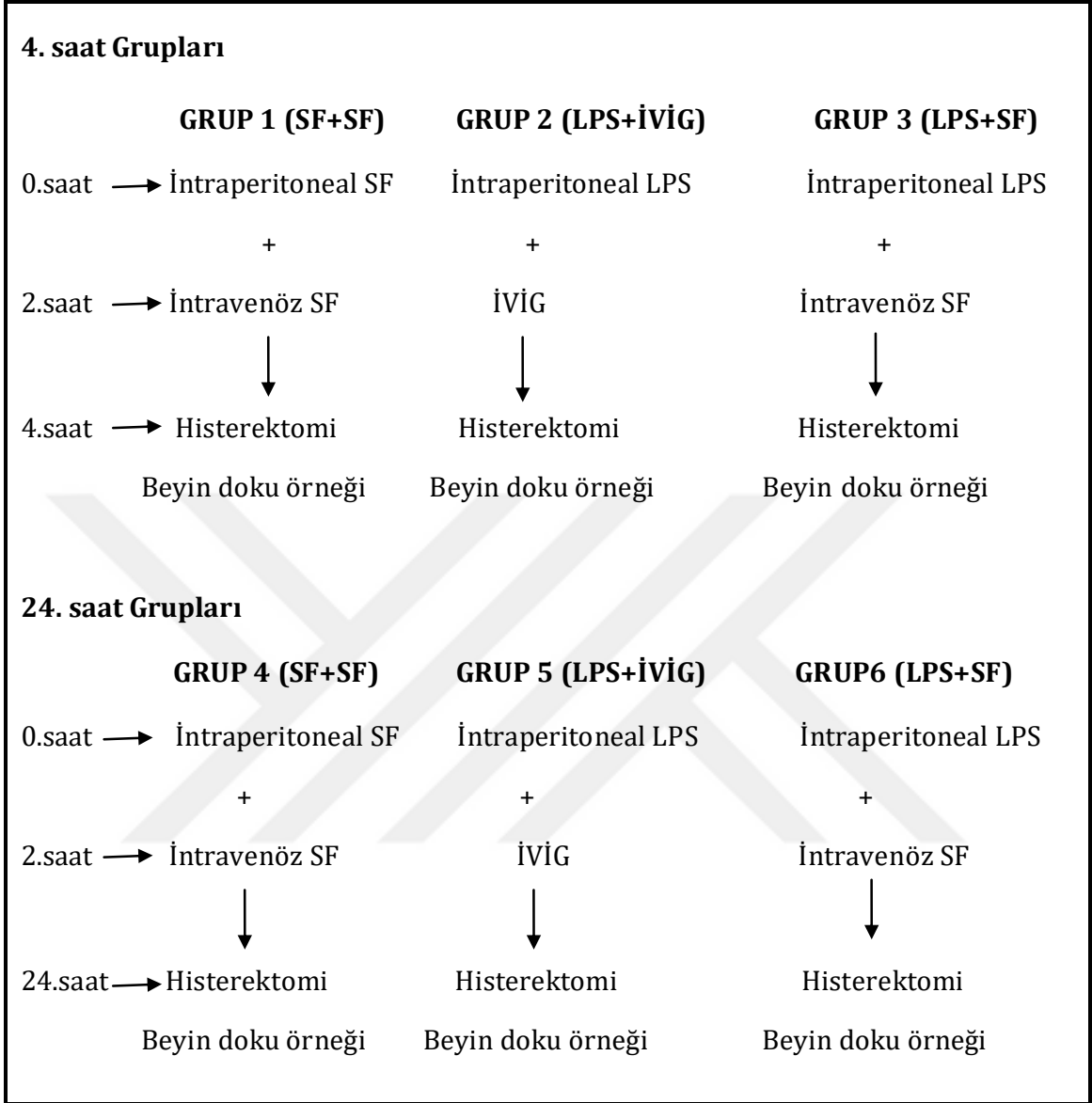
Çalışma Wistar-Albino cinsi 200-280 gr arasında ağırlığa sahip, dişi ratlarda yapıldı. Deney boyunca normal rat yemi ve musluk suyu ile beslendiler, su ve yem kısıtlanması yapılmadı. 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda tutuldu. Çalışma ile ilgili Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındı (05.01.2010. Değerlendirme no:10-01/01, karar no:01).

3.2. Çalışma Protokolü

Çalışmaya alınan dişi ratlara 3 gün erkek ratların talaşı ile östrus siklusuna girmeleri için indüksiyon yapıldı. Dişi ratlar daha sonra erkek ratlar ile saat 20.00'de aynı kafese konularak çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün saat 08.00'de dişilerden vajinal smear alınarak sperm arandı. Sperm saptanan dişilerin gebelikleri 0.5 gün kabul edilerek dişiler ayrı kafese konuldu. Gebeliklerinin 19. gününe kadar beklemeye bırakıldı. Gebeliklerinin 19. gününde dişiler randomize olarak 6 gruba ayrıldı.

1. Grup 1'e (4. saat grubu SF+SF) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatte LPS hacmine eşdeğer miktarda (0.3 mg/kg) intraperitoneal %0.9 NaCl solüsyonu (SF) verildi. SF'den 2 saat sonra İVİG hacmine eşdeğer miktarda SF, eter anestezi altında uyutularak kuyruk veninden intravenöz olarak verildi. İntraperitoneal SF'den 4 saat sonra gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme yapıp sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (Çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).
2. Grup 2'ye (4. saat grubu LPS+İVİG) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatteki intraperitoneal LPS (Escheria Coli 0.55B5, Sigma St.Louis, MO, USA) 0.3 mg/kg uygulanmasından 2 saat sonra kuyruk veninden eter anestezi altında uyutularak 1 gr/kg dozunda İVİG verildi (Tegeline Er-Kim). LPS'den 4, İVİG'den 2 saat sonra gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).

3. Grup 3'e (4. saat LPS+SF) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatteki intraperitoneal LPS 0.3 mg/kg uygulamasından 2 saat sonra, 1 gr/kg İVİG'e eşdeğer hacimde SF kuyruk veninden eter anestezi altında uyutularak verildi. LPS'den 4 saat, SF'den 2 saat sonra gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (Çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).
4. Grup 4'e (24. saat SF+SF grubu) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatte LPS hacmine eşdeğer miktarda intraperitoneal SF uygulanmasından 2 saat sonra kuyruk veninden eter anestezi altında İVİG hacmine eşdeğer miktarda intravenöz SF verildi. Ratlar kafeslerine konularak bekletildi. LPS uygulamasının 24. saatinde gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme, sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (Çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).
5. Grup 5'e (24. saat LPS+İVİG grubu) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatteki intraperitoneal LPS 0.3 mg/kg uygulanmasından 2 saat sonra kuyruk veninden eter anestezi altında İVİG 1 gr/kg dozunda verildi. Ratlar kafeslerine konularak bekletildi. LPS uygulamasının 24. saatinde gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (Çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).
6. Grup 6'ya (24. saat LPS+SF grubu) (gebeliklerinin 19. gününde) 0. saatte intraperitoneal LPS 0.3 mg/kg uygulanmasından 2 saat sonra kuyruk veninden eter anestezi altında İVİG hacmine eşdeğer miktarda intravenöz SF verildi. Ratlar kafeslerine konularak bekletildi. LPS uygulamasının 24. saatinde gebe ratlar önce %4 halotanla yükleme, sonra %1-1.5 halotanla idame yapılarak uyutuldu ve histerektomi uygulanarak yavrular çıkarıldı. Ölen ve canlı olan yavru ratlar sayıldı, canlı olan yavru ratların beyin dokuları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı (Çalışmaya alınan yavru rat sayısı 30).



Şekil 3.1. Çalışma protokol şeması.

Elde edilen beyin dokularının tümünde (Grup 1, 2, 3, 4, 5, 6) ratlara spesifik TNF- α , IL-1 β kitleri kullanılarak [(MAB510), (MAB5011) R&D systems, Inc. Minneapolis, MN] western blot yöntemi ile TNF- α ve IL-1 β düzeyleri çalışıldı. Ayrıca 24. saatte çıkarılan beyin dokularında (Grup 4, 5, 6) bu iki sitokine ek olarak kolorimetrik yöntemle kaspaz 3 kiti [(KHZ1001) Invitrogen Corporation Camarillo, CA] kullanılarak kaspaz 3'ün aktivitesi çalışıldı.

3.3. Çalışma Yöntemi

3.3.1. Western blot yöntemi

Western blot yönteminde TNF- α , IL-1 β tayini için beyin dokuları mekanik olarak parçalandı. Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle denatüre edilerek ikincil ve üçüncül yapılarını kaybeden proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı. Daha sonra transfer proteinler polivinildin diflorid (PVDF) [(RPN303F) Amersham, Buckinhamsire, UK] membranlara SDS ile negatif olarak kaplandılar ve akrilamid jelde pozitif alana doğru göç ettiler. Proteinlerin tespiti için TNF- α , IL-1 β yada beta-aktin (sc-56055 Santa-cruz, CA) ile işaretli antikorlar kullanıldı. Beyin örnekleri SDS-PAGE jelde elektrik akımına maruz kaldıktan sonra proteinler molekül ağırlıklarıyla orantılı olarak anota göç ettiler ve jelde buldukları yerde bant halinde yığılım gösterdiler. Elde edilen filmler daha sonra image j programı ile sayısal değere dönüştürüldü.

3.3.2. Kolorimetrik yöntem

Kalorimerik yöntemde beyin örnekleri santrifüj edilerek süpernatantları alındı. Kaspaz-3'ün substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVDpNA) kromofor p-nitroanilinin (pNA) serbestleşmesi sağlandı. Her örnek için ayrı buffer kullanılarak oda ısısında ve karanlık ortamda 2 saat bekletildikten sonra 400-450 nm dalga boyunda mikropate okuyucu (Bio-Tek) ile okunarak kaspaz 3'ün aktivitesi değerlendirildi.

3.4. Kullanılan Biyoistatistiksel Yöntem

Veriler SPSS (version 11.0) (SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme TNF α , IL-1 β için “Mann-Whitney U” testi ile kaspaz 3 aktivitesi ise Welch testi ve ANOVA testi kullanılarak yapıldı. p<0.005 olarak tespit edilen değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney aşaması 6 ay, çalışma aşaması 6 ay sürdü. LPS başlangıçta 0,5 µg/kg dozunda uygulandı. Ancak uygulama sonrası gebe ratların hepsinin kaybedilmesi üzerine LPS dozu 0,3 µg/kg'a indirildi. Doz azaltılmasına rağmen Grup 2'de 5 yavru ve 1 gebe rat, Grup 3'de 8 yavru ve 2 gebe rat, Grup 5'de 6 yavru rat, Grup 6'da 11 yavru ve 2 gebe rat kaybedildi. İVİG deneklerce iyi tolere edildi.

Birinci grubun kilosu 2.34±0.37 gr, 2. grubun 1.97 ±0.38 gr, 3. grubun 2.14 ±0.53 gr, 4. grubun 2.02±0.27 gr, 5 grubun 2.16± 0.23 gr, 6. grubun ise 1.19±0.43 gr arasında değişmekteydi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Yavru ratların kiloları.

Fetus	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
1	1,60	1,20	1,05	1,55	1,45	0,55
2	1,75	1,20	1,10	1,60	1,80	0,55
3	1,80	1,35	1,40	1,65	1,85	0,55
4	1,95	1,40	1,50	1,65	1,90	0,55
5	1,95	1,45	1,50	1,70	1,95	0,60
6	2,00	1,60	1,50	1,75	1,95	0,65
7	2,00	1,65	1,50	1,80	2,00	0,65
8	2,00	1,75	1,65	1,80	2,05	0,65
9	2,05	1,80	1,70	1,85	2,10	0,90
10	2,05	1,85	1,70	1,85	2,10	1,10
11	2,15	1,90	2,05	1,90	2,10	1,10
12	2,15	1,90	2,10	1,95	2,15	1,15
13	2,15	1,95	2,30	1,95	2,15	1,15
14	2,20	1,95	2,30	2,00	2,15	1,15
15	2,20	2,00	2,30	2,00	2,20	1,25
16	2,25	2,05	2,35	2,05	2,20	1,35
17	2,35	2,10	2,35	2,05	2,20	1,35
18	2,35	2,10	2,40	2,10	2,25	1,35
19	2,40	2,10	2,40	2,10	2,25	1,40
20	2,45	2,15	2,45	2,15	2,25	1,45
21	2,50	2,25	2,50	2,15	2,25	1,45
22	2,50	2,25	2,55	2,15	2,25	1,50
23	2,55	2,25	2,55	2,20	2,25	1,50
24	2,60	2,25	2,60	2,25	2,25	1,55
25	2,60	2,35	2,65	2,30	2,40	1,55
26	2,70	2,40	2,65	2,35	2,40	1,55
27	2,80	2,40	2,70	2,35	2,45	1,60
28	2,95	2,45	2,70	2,40	2,45	1,65
29	3,00	2,45	2,75	2,50	2,45	1,95
30	3,05	2,60	2,90	2,55	2,55	2,00

4.1. TNF- α Düzeyleri

4.1.1. 4. saat gruplarının karşılaştırılması

Grup 1 (4.saat SF+SF) ile Grup 2 (4.saat LPS+İVİG)'nin TNF- α düzeyleri karşılaştırıldığında 2. grubun düzeyi 1. gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.023$) (Çizelge 4.2).

Grup 1 (4.saat SF+SF) ile Grup 3 (4.saat LPS+SF)'ün karşılaştırılmasında 1. gruba ait düzeyin 3. gruba kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p=0.003$) (Çizelge 4.2).

Grup 2 (4.saat LPS+İVİG) ile Grup 3 (4.saat LPS+SF)'ün karşılaştırılmasında 2. gruba ait düzeyin 3. gruba kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p=0.002$) (Çizelge 4.2).

Sonuç olarak;

Grup 2 (LPS+İVİG) < Grup 1 (SF+SF) < Grup 3 (LPS+SF) (Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. 4. saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar (4.saat grupları)	TNF- α (pg/ml)#	p*
Grup 1 (SF+SF)	1.00 (0.11-10.63)	0.023
Grup 2 (LPS+İVİG)	0.84 (0.09-12.01)	
Grup 1(SF+SF)	1.00 (0.11-10.63)	0.003
Grup 3 (LPS+SF)	1.85 (0.12-16.96)	
Grup 2 (LPS+İVİG)	0.84 (0.09-12.01)	0.002
Grup 3 (LPS+SF)	1.85 (0.12-16.96)	

#Ortanca (minimum-maksimum), * $p<0.05$

4.1.2. 24. saat gruplarının karşılaştırılması

Grup 4 (24.saat SF+SF) ile Grup 5 (24.saat LPS+İVİG)'in TNF- α düzeyleri karşılaştırıldığında ise tersine 4. grubun düzeyi 5. gruba kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0.001$) (Çizelge 4.3).

Grup 4 (24.saat SF+SF) ve Grup 6 (24.saat LPS+SF)'in TNF- α düzeyleri arasında istatistiki anlamlılık bulunamadı ($p=0.79$) (Çizelge 4.3).

Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) ile Grup 6 (24.saat LPS+SF)'nın TNF- α düzeyleri karşılaştırıldığında ise tersine 6. grubun düzeyi 5. gruba kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.001$) (Çizelge 4.3).

Sonuç olarak;

Grup 4 (SF+SF) ≠ Grup 6 (LPS+SF) < Grup 5 (LPS+İVİG) olarak değerlendirildi (Şekil 4.2).

Çizelge 4.3. 24. saat gruplarında TNF-α düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar (24.saat grupları)	TNF-α (pg/ml)#	p*
Grup 4 (SF+SF)	0.46 (0.02-48.96)	0.001
Grup 5 (LPS+İVİG)	2.39 (0.14-32.64)	
Grup 4 (SF+SF)	0.46 (0.02-48.96)	0.79
Grup 6 (LPS+SF)	0.62 (0.03-14.00)	
Grup 5 (LPS+İVİG)	2.39 (0.14 -32.64)	p<0.001
Grup 6 (LPS+SF)	0.62 (0.03-14.00)	

#Ortanca (minimum-maksimum), *p<0.05

4.2. IL-1β Düzeyleri

4.2.1. 4. saat gruplarının karşılaştırılması

Grup 1 (4.saat SF+SF) ile Grup 2 (4.saat LPS+İVİG)'nin IL-1β düzeyleri karşılaştırıldığında 2. grubun düzeyi 1. gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001) (Çizelge 4.4).

Grup 1 (4.saat SF+SF) ile Grup 3 (4.saat LPS+SF)'ün karşılaştırılmasında 1. gruba ait düzeyin 3. gruba kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.4).

Grup 2 (4.saat LPS+İVİG) ile Grup 3 (4.saat LPS+SF)'ün karşılaştırılmasında 2. gruba ait düzeyin 3. gruba kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.4).

Sonuç olarak;

Grup 2 (LPS+İVİG) < Grup 1 (SF+SF) < Grup 3 (LPS+SF) (Şekil 4.3).

Çizelge 4.4. 4. saat gruplarında IL-1β düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar (4.saat grupları)	IL-1β (pg/ml)#	p*
Grup 1 (SF+SF)	0.95 (0.09-8.65)	p<0.001
Grup 2 (LPS+İVİG)	0.07 (0.00-2.54)	
Grup 1 (SF+SF)	0.95 (0.09-8.65)	p<0.001
Grup 3 (LPS+SF)	2.08 (0.13-84.48)	
Grup 2 (LPS+İVİG)	0.07 (0.00-2.54)	p<0.001
Grup 3 (LPS+SF)	2.08 (0.13-84.48)	

#Ortanca (minimum-maksimum), *p<0.05

4.2.2. 24. saat gruplarının karşılaştırılması

Grup 4 (24.saat SF+SF) ile Grup 5 (24.saat LPS+İVİG)'in IL-1 β düzeyleri karşılaştırıldığında ise 5. grubun düzeyinin 4. gruba kıyasla daha düşük olduğu tespit edildi ancak, iki değer arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı (p=0.49) (Çizelge 4.5).

Grup 4 (24.saat SF+SF) ve Grup 6 (24.saat LPS+SF) karşılaştırıldığında Grup 4'ün düzeyleri Grup 6'ya kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (p=0.041) (Çizelge 4.5).

Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) ve Grup 6 (24.saat LPS+SF)'nin düzeyleri karşılaştırıldığında ise Grup 5'in düzeyinin Grup 6'ya kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.5).

Sonuç olarak;

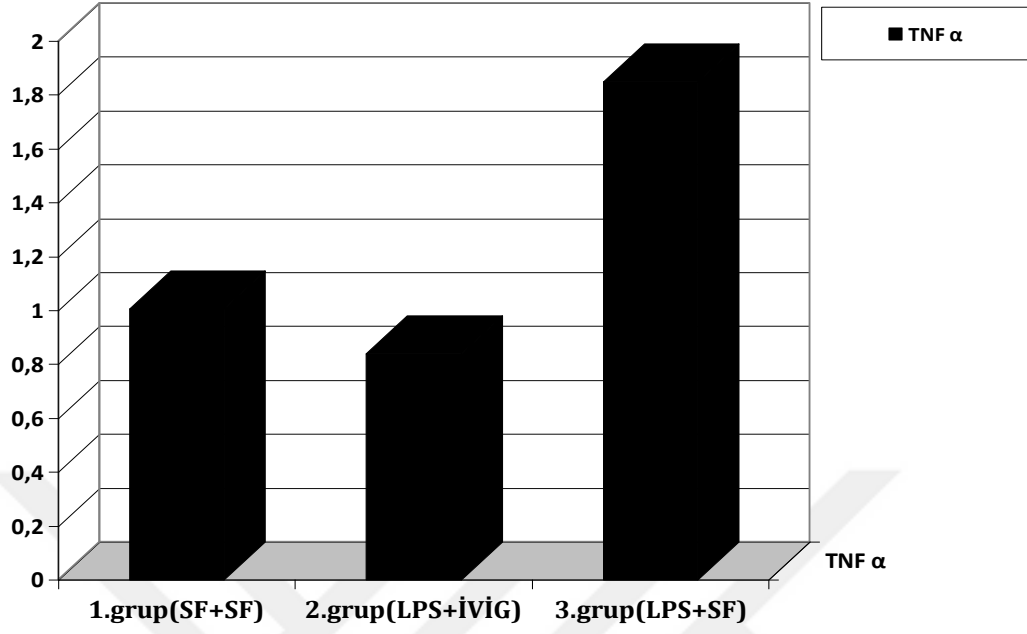
Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) \neq Grup 4 (24.saat SF+SF) < Grup 6 (24.saat LPS+SF)
(Şekil 4.4).

Western blot yöntemiyle IL-1 β düzeylerinin, en fazla Grup 6 (24.saat LPS+SF), en düşük Grup 5 (24.saat LPS+İVİG)'de eksprese edildiği görülmektedir (Şekil 4.5).

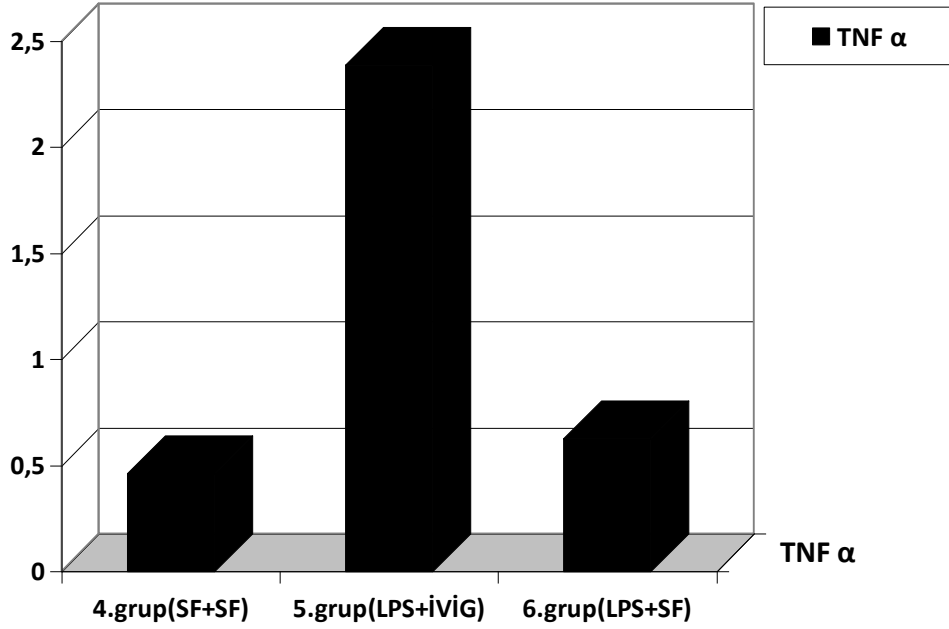
Çizelge 4.5. 24.saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar (24.saat grupları)	IL-1 β (pg/ml) #	p*
Grup 4 (SF+SF) Grup 5 (LPS+İVİG)	0.84 (0.02-68.39) 0.73 (0.07-12.02)	0.49
Grup 4 (SF+SF) Grup 6 (LPS+SF)	0.84 (0.02-68.39) 1.65 (0.12-28.94)	0.041
Grup 5 (LPS+İVİG) Grup 6 (LPS+SF)	0.73 (0.07-12.02) 1.65 (0.12-28.94)	p<0.001

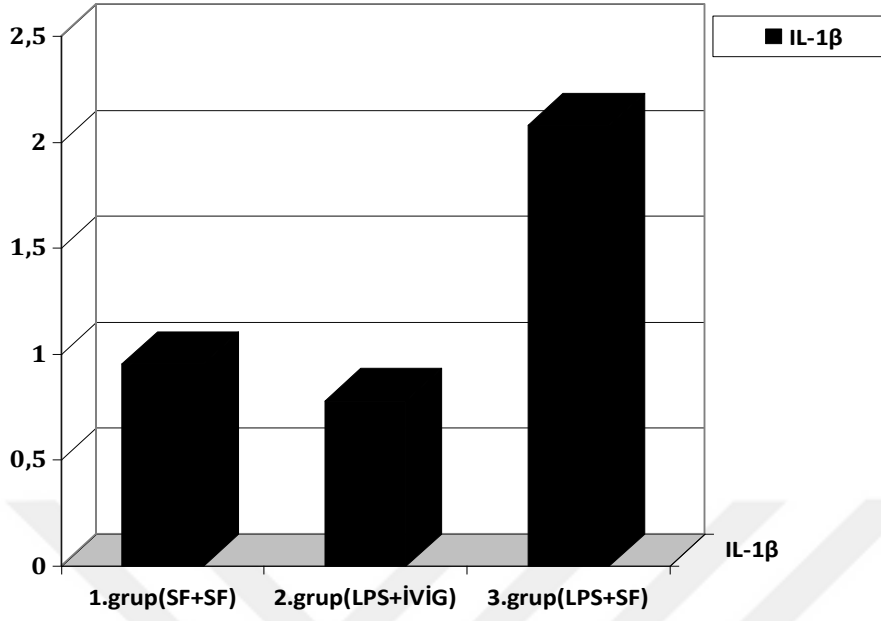
#Ortanca (minimum-maksimum), *p<0.05



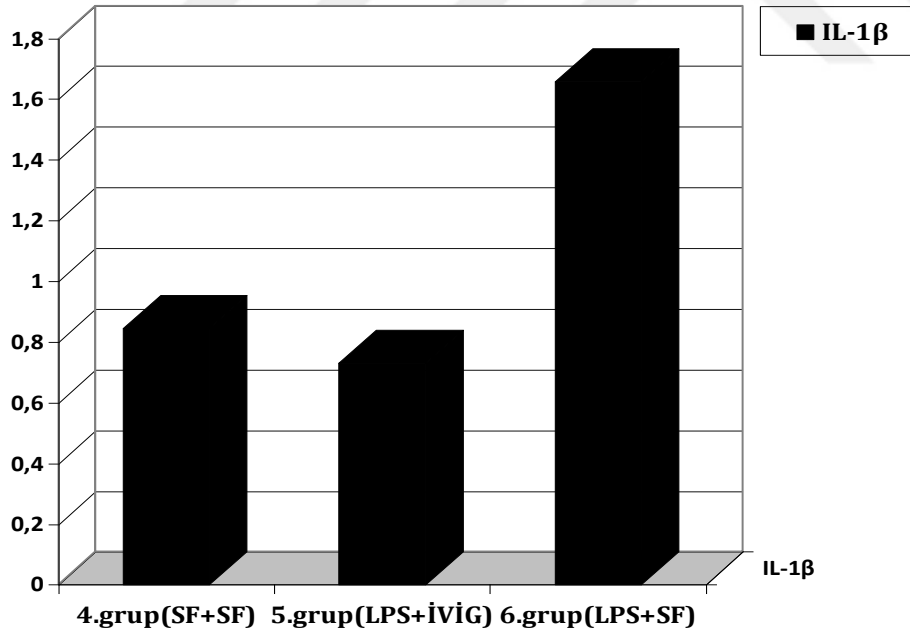
Şekil 4.1. 4. saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.



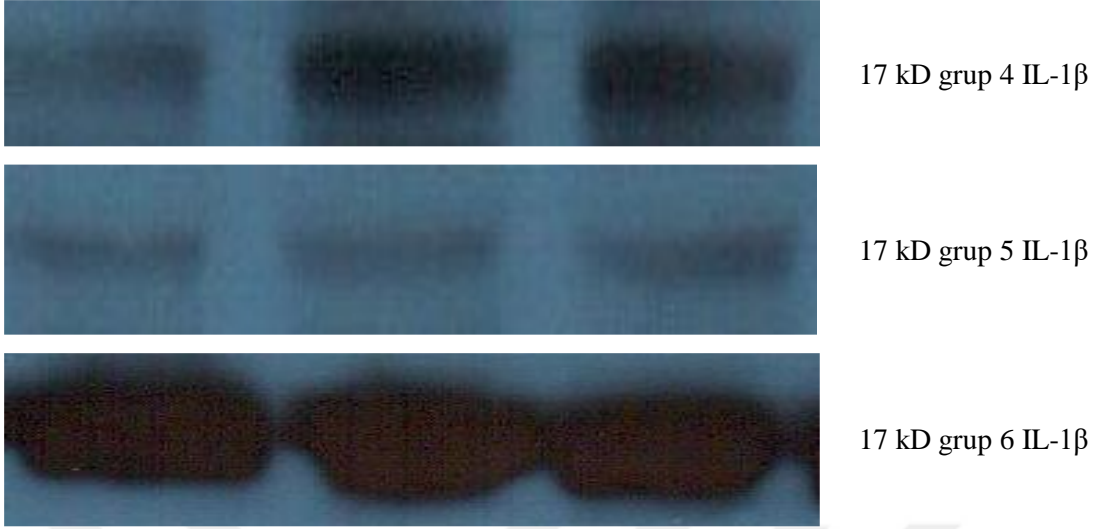
Şekil 4.2. 24. saat gruplarında TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.3. 4. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.4. 24. saat gruplarında IL-1 β düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.5. IL-1 β 'nin 4. saatte Western Blot yöntemi ile görüntüsü.

4.3. Kaspaz 3 Aktivitesi

4. grup ile 5. grup kaspaz aktivitesi açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.47$) (Çizelge 4.6).

4. grup ile 6. grup karşılaştırıldığında 6. grubun kaspaz aktivitesi 4. gruba göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.03$) (Çizelge 4.6).

5. grup ile 6. grubun kaspaz aktiviteleri karşılaştırıldığında 6. grubun kaspaz aktivitesi 5. gruba kıyasla anlamlı yüksek bulundu ($p=0.013$) (Çizelge 4.6).

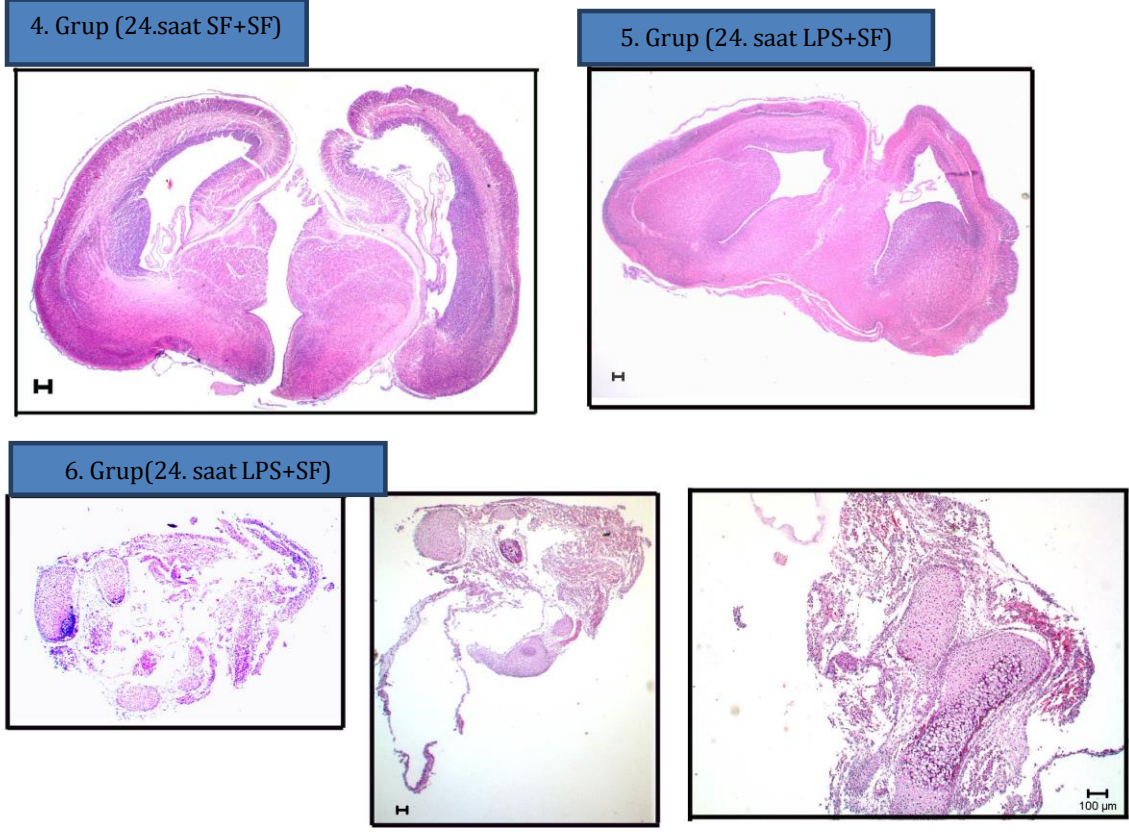
Sonuç olarak;

Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) \neq Grup 4 (24.saat SF+SF) < Grup 6 (24.saat LPS+SF)

Çizelge 4.6. 24. saat gruplarında kaspaz aktivitesinin karşılaştırılması.

Gruplar (24. saat grupları)	Kaspaz 3 aktivitesi, (nmol pNA/mg protein)#	p*
Grup 4 (24.saat SF+SF)	<20* (<20*-0.3502)	0.47
Grup 5 (24.saat LPS+İVİG)	<20*(<20 *-0.3082)	
Grup 4 (24.saat SF+SF)	<20 *(<20*-0.3502)	0.031
Grup 6 (24.saat LPS+SF)	0.083(<20 *-0.9592)	
Grup 5 (24.saat SF)	<20 *(<20*-0.3082)	0.013
Grup 6 (24.saat LPS+SF)	0.083(<20*-0.9592)	

#Ortanca (minimum-maksimum), * $p<0.05$, *pNA<20 μ mg ölçülememektedir.



Scale bar: 50 mikrometre.

Resim 4.1. 24 saatlik gruplardan rastgele birer örnek alınarak yapılan immünohistokimya ve tünel boyalı kesitler.

24 saatlik gruplardan rastgele seçilen birer numuneye kaspaz 3 immünohistokimyasal ve tünel boyası yapılarak kaspaz yoğunluğu değerlendirildi. 6. Grupta diğer 2 gruba göre artmış kaspaz yoğunluğu saptandı. Ancak tüm 24 saatlik grupların hepsine yapılmadığı için istatistiksel analiz uygulanmadı.

5. TARTIŞMA

Preterm doğuma ve neonatal komplikasyonlara neden olan faktörlerin başında intrauterin infeksiyon ve/veya inflamasyon gelmektedir. İntrauterin infeksiyonlar genellikle subklinik formda seyretmekte ve çoğu zaman atlanmaktadır. Maternal dokular başta Gram (-) bakteriler olmak üzere değişik mikrobiyal ajanlar tarafından enfekte edilmekte, bu ajanlar plasenta ve fetal membranlarda inflamatuvar reaksiyonu başlatmaktadır. Mikroorganizmalar fetal dokulara ya asendan yada hematojen yol ile ulaşmaktadır Mikroorganizma veya ürünlerinin fetusa ulaşması sitokin salınışına ve FIRS'e neden olmaktadır. İnflamatuvar cevap, doğuma yakın dönemde annenin geçirdiği infeksiyona bağlı artan sitokinlerin amniyotik sıvıya ve oradan fetusa geçmesi yada fetus tarafından yapılması ile olabileceği gibi, bizzat bebeğin kendisinin geçirdiği erken postnatal infeksiyonla da başlayabilmektedir. Nasıl başlarsa başlasın, oluşan inflamatuvar cevap, fetal veya neonatal beyin hasarına neden olmakta ve ileride CP gelişimine yol açmaktadır. Bakteriyel toksinlerle başlayan hasar, devam eden inflamatuvar cevap sırasında ortaya çıkan proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, kaspaz sistemi ile kalıcı hale gelmektedir (28,73).

Son yıllarda preterm doğum oranları belirgin artmıştır. Koryoamniyonit preterm doğumun en sık nedeni olup, bu bebeklerde FIRS sık ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle dünyada son yıllarda en çok üzerinde durulan konulardan biri FIRS ve FIRS'in özellikle santral sinir sistemi ve akciğerde yaptığı etkiler ve bu etkilerin nasıl önleneceği yada ilerleyen inflamasyonun herhangi bir tedavi ajanı ile durdurulup durdurulamayacağıdır (34,38,42).

FIRS varlığı ciddi neonatal mortalite ve morbiditelere neden olmaktadır. Yapılan geniş çaplı çalışmalara göre koryoamniyonite bağlı ölümler ülkelere göre %10 ile %95 arasında değişmektedir (117-119). Moyo ve ark.(120)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, ölü doğumların %9'unda (6/66) koryonik tabakada vaskulit (OR: 14, 95% CI: 2.8-72) saptanmış ve ölü doğumları FIRS'e bağlamışlardır. Hitti ve ark. (121)'nin açılmamış membranları olan afebril anneden doğan 151 prematür bebeğin annelerinden amniyosentezle elde ettikleri amniyotik sıvı örneklerinde, gebelerin 45'inde (%30), doğumdan sonraki ilk 24 saatte ölen 11 bebekten 9'unda ve yaşayan 140 bebekte amniyotik sıvıda kültür pozitifliği saptamışlardır. Yaşayan bebeklerde oluşan RDS, evre 3-4 IVK, NEK ve multiorgan yetmezliğinin kültür pozitifliği ile ilişkili olabileceğini

düşünmüşlerdir. Sperling ve ark. (122) ise düşük doğum tartısına intraamniyotik enfeksiyonun eşlik etmesi halinde fetal ölümlerin (%0'dan %10.8) arttığını bildirmişlerdir.

İnflamasyonun santral sinir sistemindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmış olan deneysel çalışmalarda, hem denek kaybetmemek, hem de yeterli sitokin cevabını alabilmek için LPS'nin farklı doz ve şekillerde uygulandığı dikkat çekmektedir. Bell ve ark. (123) gebe ratların gestasyonlarının 15. gününde 0.1 mg/kg dozunda LPS'yi serviksi cerrahi mikroskop ve spekülüm yardımıyla açarak intraservikal olarak uygulamışlardır. Pang ve ark (7) ise ratların postnatal 5. gününde kafatası ve bregmayı insize ederek LPS'yi intraserebral enjekte etmişler ve beyin hasarını değerlendirmişlerdir. Ning ve ark. (4) ile Cai ve ark. (10) gestasyonlarının 18. ve 19. günlerinde gebe ratlara intraperitoneal olarak 0.5 mg/kg LPS uygulamışlar, 20 rattan 11 tanesini kaybetmişlerdir. Golan ve ark. da (124) önce 0.3 µg sonra 0.12 µg/kg LPS'yi intraperitoneal olarak uygulamayı tercih etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ratların normal gebelik sürelerinin 23 gün olması gözönüne alınarak, yavrular preterm doğum zamanı için diğer çalışmalarda da tercih edilen 19. gün sezaryanla doğurtulmuştur. Ayrıca uygulama kolaylığı ve sedasyon gerektirmemesi nedeniyle intraperitoneal yol tercih edilmiş, çalışmamızın başında LPS 0.5 mg/kg dozunda uygulanmış ancak yavru ve gebe rat ölümlerinin çok oluşu nedeniyle doz 0.3 mg/kg'a indirilmiştir. Bu dozun yeterli sitokin cevabı alınabilecek bir değer olduğu, Grup 3 (4. saat LPS+SF)'deki yavruların beyin dokularında hem TNF- α , hem de IL-1 β seviyelerin diğer 2. gruba (Grup 2 (LPS+İVİG) < Grup 1 (SF+SF) < Grup 3 (LPS+SF) kıyasla yüksek değerde bulunması ile gösterilmiştir. Ancak LPS dozunun indirilmesine rağmen Grup 2'de 5 yavru ve 1 gebe rat, Grup 3'de 8 yavru rat ve 2 gebe rat, Grup 5'de 6 yavru rat, Grup 6'da 11 yavru rat ve 2 gebe rat kaybedilmiştir.

Araştırmalarda inflamasyonun takip kriteri olarak daha çok TNF- α , IL-6, IL-1 β düzeyleri kullanılmıştır. Ancak Bell ve ark. (123) beyin dokularında TNF- α ve IL-6'ya ek olarak IL10 ve IFN- γ 'yı çalışmışlar, Pang ve ark. (7) ise LPS uygulaması sonrası TNF- α , IL-6, IL-1 β ile birlikte indüklenbilir nitrik oksit (iNOS) fetal beyin dokularındaki ekspresyonunu ölçmüşlerdir. Deguchi ve ark. (125) santral etkilenmeyi değerlendirmek için PVL'li infantlarda TNF- α , glial fibriler astrositik protein (GFAP) ve β -Amyloid prekürsör protein (β APP) düzeylerini, Golan ve ark. (124) da LPS'nin neden olduğu inflamatuvar yanıtı değerlendirmek için dokularda IL-6 ile birlikte beyin kökenli BDNF ve NGF düzeylerini çalışmışlardır.

Bizim çalışmamızda ise inflamasyon varlığının değerlendirilmesi için TNF- α , IL-1 β düzeyleri, tedavinin başarılı olup olmadığının değerlendirilmesi için ise apoptozun önemli göstergesi olan kaspaz 3 tayini tercih edilmiştir. Ayrıca santral inflamasyona etkisini araştırmayı amaçladığımız immünglobulinin, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α) üretimini engellemesi ve IL-1 ile IL-1 reseptörünün doğal antagonistlerinin üretimini ve ekstraselüler alana salınmasını hızlandırdığının gösterilmiş olması da bu 2 sitokinin bakılması tercihimizde etkili olmuştur (15,126,127).

TNF- α düzeylerinin LPS uygulamasından sonraki 0.5 ile 1 saat içinde bazal değere göre arttığı ve 24. saatte bazal değere indiği düşünülmektedir (4,7,23). IL-1 β 'nın ise 0.5-2 saatler arası artmaya başladığı, 24. saatte pik yaptığı ve 72 saatte bazal değere indiği bildirilmektedir (4,7,123). Ancak yapılan araştırmalarda her iki sitokin için de örnek alma zamanı çalışmadan çalışmaya geçtiğinden, saptanan pik değere ulaşma zamanı da buna paralel olarak değişiklik göstermektedir. Pang ve ark. (7) LPS enjeksiyonu sonrası TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerini 0.5, 2, 6, 24, 48, 72 ve 216. saatlerde ölçmüşler, TNF- α 'nın 2. saatte pik yaptığını ve 24. saatte bazal değere indiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada IL-1 β 'nin 0.5-2. saatlerde yükselmeye başladığı ve 72. saatte bazal değere inmiş olduğu gösterilmiştir. Ning ve ark. (4) ise TNF- α 'nın LPS enjeksiyonundan sonraki 1.5. saatte yeni yükselmeye başladığını bildirmişlerdir. Cai ve ark. (10) LPS enjeksiyonu sonrası 1., 4. ve 24. saatlerde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerine bakmışlar, IL-1 β 'nin en yüksek düzeyine 1. saatte ulaştığını, TNF- α 'nın ise LPS sonrası 24. saatte hala ölçülebilir düzeyde olduğunu saptamışlardır. Aynı grubun yapmış olduğu başka bir çalışmada TNF- α , IL-1 β düzeyleri LPS enjeksiyonundan 2, 6, 24 saat sonra ve 3. ve 11. günlerde değerlendirilmiş ve TNF- α 'nın 6. saatte en yüksek düzeye çıktığı tespit edilmiştir (6). Çalışmalardaki bu farklılıkların, örnek alma zamanı yanında uygulanan LPS dozu ve uygulama yeriyle de ilgili olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda örnek alma zamanı, her iki sitokin içinde LPS uyguladıktan sonraki 4. ve 24. saatler alınarak seçilmiştir. Bu saatler çalışmaların çoğunluğunda yüksek değere ulaşma zamanının TNF- α için 1-2 saat, bazal değere inme zamanının 24. saat, IL-1 β için ise 0.5-2 ve 72 saat olarak belirlenmesi nedeniyle seçilmiştir. Ancak İVİG'in uygulamadan ne kadar süre sonra sitokin düzeylerini etkileyeceği konusunda herhangi bir veri bulunmadığı için, çalışmamızda immünglobulinin sitokinlere etkilerini değerlendirme açısından doğru örnek alma zamanının seçilip seçilmediği net değildir. Ayrıca kontrol grubu olan Grup 1 (SF+SF)'deki 4. saat değerlerinin hem TNF- α hem de

IL-1 β için neden Grup 2 (LPS+İVİG)'den yüksek saptandığı ve bu bulgunun örnek alma zamanı ile ilgisi olup olmadığı konusunda bir yorum yapmamız da mümkün olamamıştır.

İnflamatuvar perinatal beyin hasarı modellerinde kaspaz 3 aktivasyonu, apopitozun gösterilmesi amacıyla çalışılmıştır. Patrick ve ark. (128) domuzlara, gebeliklerinin son trimesterinde bakteri inoküle etmişler, inflamatuvar cevabı kaspaz 3 ile değerlendirerek, inokülasyonun 48. saatinde en yüksek düzeyde olduğunu ve 72. saatinde ise aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir. Geniş bir zaman diliminde kaspaz 3'ü çalışan Cai ve ark. (6) ise intraventriküler LPS enjeksiyonundan sonra 2., 6., 24. saatlerde ve 3., 11. günlerde kaspaz 3'ün aktivitesini kolorimetrik olarak değerlendirmişler, aktivitesinin en yoğun olduğu sürenin 24. saat olduğunu tespit etmişlerdir. Sharangpani ve ark. (9) ile Nortinton ve ark. (129) da benzer şekilde, kaspaz 3 aktivitesinin inflamasyonun 24. saatinde yoğun olarak devam ettiğini saptamışlardır. Arumugam ve ark. (130) ise inme modelinde İVİG'in kaspaz 3'ü azaltarak hücre hasarının engellenmesinde olumlu rol oynadığını göstermiştir.

Çalışmamızda kaspaz 3 açısından, araştırmaların çoğunda aktivitesinin inflamasyondan 24 saat sonra en yüksek düzeyde saptanabildiği göz önüne alınarak, örnek alma zamanı için LPS uygulamasının 24. saati tercih edilmiştir.

FIRS'in mortalitesi ve sekeli yüksek bir inflamasyon olması nedeniyle bu sendrom için değişik tedavi yöntemleri denenmiştir. Antibiyotiklerin preterm doğumlarda gebeye uygulanması mikrobiyal invazyonu engellemektedir. ORACLE 1 çalışmasında, antibiyotik kullanımının hem erken membran rüptürünü engellediği, hem de neonatal morbidite ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (91). Antibiyotikler ile immünmodülatörlerin (deksametazon ve indometazin) birlikte kullanılmasının benzer şekilde, özellikle Grup B Streptokoklar ile amniyon sıvısının enfekte olduğu durumlarda infeksiyonu azalttığı, fetal inflamatuvar cevabı baskıladığı ve preterm doğum eylemini engelleyerek gestasyon süresini uzattığı saptanmıştır (131). Terrone ve ark. (132) inflamatuvar süreci baskılamak için antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'u kullanmışlar ve preterm doğumlarda uygulandığında neonatal morbiditeyi azalttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Mesples ve ark. (133) IL-10 ile birlikte eş zamanlı IL-1 β 'yı ratlara intraperitoneal olarak uygulamışlar ve IL-10'un IL-1 β ekspresyonunun toksik etkilerini azalttığını ve nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Başka bir antiinflamatuvar mediatör olan TGF- β 'nın, posthemorajik hidrosefalisi olan yenidoğanlarda ve intraventriküler kanaması olan preterlerlerde (134, 135) IL-1 β 'nın

indüklediği santral inflamasyonun baskılanmasında etkili olduğu bulunmuştur (136). Erişkin rat modellerinde TGF- β 'nın intraserebral yolla uygulanmasının hem kısa hem de uzun süreli mortalite ve morbiditeyi azalttığı gösterilmiştir (137). Kumral ve ark (138) LPS'nin indüklediği fetal beyin hasarında eritropoetini kullanmışlar, eritropoetinin TNF- α , IL-6, IL-1 β ekspresyonunu azaltarak santral hasarlanmayı ve apoptozu engellediğini göstermişlerdir. Yapılan kohort çalışmalarında, özellikle preterm doğum eylemi olan gebelere uygulanan steroidlerin; RDS, NEK, İVK ve erken başlangıçlı sepsisi azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmalarda, histolojik koryoamniyoniti olan gebelere antenatal steroid uygulanmasının güvenli olduğu ve neonatal mortaliteyi azalttığı, RDS, NEK, İVK ve CP gelişmesini önlediği, ancak koryoamniyonitin ilerlemesini engelleyip engellemediğinin tam olarak bilinmediği yorumu yapılmıştır (139-141). Damman ve Leviton (142) trofik faktörlerden olan oligotropinlerin; antiinflamatuvar sitokinleri, sitokin bağlayan proteinleri ve sitokin reseptör blokerlerini düzenleyerek oligodendrosit hasarını engellediğini göstermişler. Romero ve ark. (143) ise antenatal inflamasyona bağlı neonatal hasarı önlemek amacıyla vitamin C ve vitamin E kullanımını önermişler, santral hasarı engellediğini ve vitamin olduğu için de yan etkilerinin az olduğunu bildirmişlerdir. Bugün için ümit vaad eden ve klinik kullanıma geçirilmiş yegane yöntem olan hipotermi bile santral inflamasyonun önlenmesi ya da durdurulması değil, yavaşlatılması ya da hafifletilmesi amacıyla kullanılmakta ve olumlu etkisi daha çok orta düzey hipoksik iskemik ensefalopatilerde (HİE) görülmekte, ağır HİE'lerde prognozu değiştirememektedir (144). Ayrıca hipotermi uygulaması zamanımızda hipoksi/iskemiye bağlı ensefalopatilerde term bebekler için önerilen bir yöntem olup, literatürde bu uygulamanın infeksiyon / inflamasyona bağlı santral hasarlanmalarda ve pretermelerde denendiğine ait bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bilgilerimize göre infeksiyon/inflamasyona bağlı santral hasarlanmada etkinliği kanıtlanmış ve klinikte uygulanabilen bir yöntem ya da ilaç henüz önerilememektedir.

İntravenöz immünglobulin uygulaması değişik inflamatuvar hastalıklarda denenmiş, başarılı bulunmuş bir tedavi yöntemi olup, bu ajanın otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda immünmodülatör olarak etki ettiği kabul edilmektedir (16). Bugün Kawasaki, Guillan Barre, otoimmün sitopeniler, inme, septik şok, miyasteni gravis, multiple skleroz ve demiyelinizan nöropatiler gibi hastalıklarda klinik uygulamaya geçirilmiştir (16,107). İVİG immünmodülatuvar etkisini daha çok Fc γ reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir. İVİG Fc bölgesi aracılığıyla makrofajların, nötrofillerin,

eozinofillerin, trombositlerin, mast hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin ve B hücrelerinin üzerindeki Fc reseptörlerine bağlanmaktadır. İVİG'in değişken Fc bölgesi aracılığıyla Fc reseptörlerine bağlanması, Fc reseptörlerinin ekspresyonu ve fonksiyonunda, kompleman sisteminin aktivasyonunda düzenlenmelere, proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını sağlayan antiinflamatuvar sitokinlerin etkinleşmesine neden olmaktadır. İVİG Fc γ R blokajı yaparak patojenik otoantikörlerin nötralizasyonunu sağlamakta, kompleman komponentlerini ve sitokin salınımını düzenlemektedir. Polimerik IgG ile bağlanan periferik kan monositlerinin Fc γ R ekspresyonu ve fagositik aktiviteleri azalmaktadır (109,110). Kimberly ve ark. (145) İVİG'in antiinflamatuvar etkisini özellikle Fc reseptörleri aracılığıyla; periferik kan mononükleer hücrelerinde Fc γ R reseptör afinitesini azaltarak gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir araştırmada ise, etkin tedavi yöntemi olarak ITP'de kullanılan İVİG'in, trombositlere karşı oluşan otoantikörleri FcR bağımlı yolakla temizlediği saptanmıştır (146). Park-Min ve ark. (147) ile Leung ve ark. (148) saflaştırılmış monosit kültürlerinde veya parçalanmamış periferik kan mononükleer hücrelerde İVİG'in antiinflamatuvar ajan olarak davrandığını, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α) üretimini engellediğini ve IL-1 ile IL-1 reseptörünün doğal antagonistlerinin üretimini ve ekstraselüler alana salınmasını hızlandırdığını göstermişlerdir. Ayrıca Kawasaki hastalığında İVİG uygulamasının IL-1 üretiminde azalmaya neden olduğu da tespit edilmiştir (148). Arend ve ark. (149) ise, önce İVİG sonra LPS uygulanmış tavşanlarda, IL-1 üretiminin azaldığını göstermişlerdir. İVİG, monositler üzerindeki Fc γ reseptörleri ile etkileşerek intraselüler cAMP artışına neden olmakta ve LPS'nin indüklediği TNF- α ve IL-1 β üretimini baskılamaktadır. Li ve ark. (150) FcR yoksun farelerde İVİG'in inflamatuvar durumlarda daha etkin olduğunu bulmuşlardır.

Deneyisel modelimizde immunoglobulin, inflamatuvar cevabı azaltarak ya da durdurarak santral etkilenmeyi önlemesi amacıyla seçilmiş bir antiinflamatuvar ajandır. Bilgilerimize göre çalışmamız, immünglobulinin fetal inflamatuvar cevapta görülen santral hasarlanma üzerindeki etkisini değerlendiren ilk araştırmadır. Sonuçlarımız İVİG uygulamasının santral hasarlanmayı azaltmada etkin bir tedavi yöntemi olabileceği fikrini vermektedir ve bu yorum, LPS uygulamasından 24 saat sonra bakılan kaspaz 3 aktivitesinin, İVİG yapılanlarda anlamlı olarak düşük bulunmasına (Grup 4 ve Grup 5 için p=0.47; Grup 5 ve Grup 6 için p=0.013) dayanmaktadır.

İVİG ve sitokin düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiği zaman, İVİG uygulananlardaki IL-1 β düzeylerinin, hem 4. hem de 24. saatte İVİG uygulanmayanlara kıyasla anlamlı olarak düşük bulunması (4.saat Grup 2 < Grup 3; p<0.001) (24.saat Grup 5 < Grup 6; p<0.001), bu ajanın etkisini daha çok IL-1 β salınımını engelleyerek gösterdiğini ve bunu Fc γ reseptörlerine bağımlı mekanizma ile IL-1ra miktarını artırarak yaptığını düşündürmektedir. Ancak sadece SF uygulaması ile sitokin düzeylerinin, LPS+İVİG uygulamasına kıyasla daha yüksek seviyelere çıkması (4.saat Grup 2 < Grup 1; p<0.001) normal şartlarda beklenen bir sonuç değildir. Bu anlamlı farklılık 24. saatteki değerlendirmede ortadan kalkmış olsa da (24.saat Grup 5 \neq Grup 4; p=0.49) kontrol grubu olarak kabul edilen 1.gruptaki (4.saat SF+SF) IL-1 β düzeyinin, gruplar içinde en düşük değer olması beklenirken, neden LPS+İVİG uygulanan 2. gruptan daha yüksek değere sahip olduğunu yorumlamak pek mümkün gibi görünmemektedir.

Çalışmamızda 4. saatte LPS+İVİG uygulanan grubun TNF- α düzeyi, LPS+SF uygulanan gruba kıyasla düşük bulunmuş (4.saatte Grup 2 < Grup 3; p=0.002) ancak ikisi arasındaki farklılık, 24. saatteki değerlerinde saptanamamıştır (24. saatte Grup 6 (LPS+SF) < Grup 5 (LPS+İVİG); p<0.001). Bu bulgu İVİG uygulamasının TNF- α üzerine herhangi bir etkisi olmadığı fikrini vermektedir. Campell ve ark. (151) stafilokokal süperantijene karşı immünglobulinin sitokin cevabını değerlendirmişler, immünglobulinin TNF- α ve IFN- γ 'yı baskılamadığı ancak IL-4 sekresyonunu baskıladığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamız da Campell ve ark'nın çalışmasında olduğu gibi İVİG'in TNF- α üzerinde baskılayıcı etkisinin daha az olabileceğini düşündürmektedir.

İVİG uygulamasının kaspaz 3 aktivasyonuna etkisi değerlendirildiğinde, araştırmamızın sonuçları 24. saatte bakılmış olan Grup 5 (24. saat LPS+İVİG)'deki kaspaz 3 aktivitesinin, Grup 4 (24. saat SF+SF) ile benzer olduğunu ve bu değerın Grup 6 (24. saat LPS+SF)'dan önemli derecede düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuç İVİG uygulamasının apoptozisi anlamlı derecede düşürebildiği fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak, çalışılmış olan sitokinler, inflamatuvar olayın seyrinde önemli yapı taşları olmakla birlikte, bunların saatler içindeki seyrinden çok, dokuda yaptıkları olumsuz etki ya da hasar önemlidir ve bu hasar temel olarak apoptozistir. Deneysel modelimiz İVİG uygulamasının, kaspaz 3 aktivitesini azaltarak, apoptozisi önemli ölçüde düşürdüğünü göstermektedir. İVİG'in apoptozisi azaltma yolunun, araştırmamızda tedavi alan grupta IL-1 β 'nin anlamlı olarak düşük bulunduğu saptanmış olsa da, sadece

sitokinler olmayıp artmış kemokinler, komplemanları üzerinden de olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle İVİG uygulamasında apoptozisi azaltan yolun, sitokinlere ek olarak; IL-1Ra, C3a, C3b, C5a, C4b düzeylerine ve lökosit adezyon parametrelerine de bakarak araştırılmasının İVİG'nin santral inflamasyona bağlı hasarlanmayı nasıl azalttığı açısından daha yol gösterici olacağı inancındayız.



6. SONUÇLAR

4. saatteki TNF- α düzeylerinin gruplararası değerlendirmelerinde:

1. 2. grubun (LPS+İVİG) TNF- α düzeyleri 1. gruba (SF+SF) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.023$).
2. 1. grubun (SF+SF) düzeyleri 3. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edildi ($p=0.003$).
3. 2. grubun (LPS+İVİG) düzeyleri ise 3. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.002$).

4. saatteki IL-1 β düzeylerinin gruplararası değerlendirmelerinde:

1. 2. grubun (LPS+İVİG) IL-1 β düzeyleri, 1. gruba (SF+SF) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$).
2. 1. grubun (SF+SF) düzeyleri, 3. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$).
3. 2. grubun (LPS+İVİG) düzeyleri 3. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$).

24. saatteki TNF- α düzeylerinin gruplararası değerlendirmelerinde:

1. 4. grubun (SF+SF) TNF- α düzeyleri 5. gruba (LPS+İVİG) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.001$).
2. 4. grubun (SF+SF) düzeyleri ile 6. grubun (LPS+SF) düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.79$).
3. 6. grubun (LPS+SF) TNF- α düzeyleri 5. gruba (LPS+İVİG) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$).

24. saatteki IL-1 β düzeylerinin gruplararası değerlendirmelerinde:

1. 5. grubun (LPS+İVİG) IL-1 β düzeyleri ile 4. grubun (SF+SF) IL-1 β düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.49$).
2. 4. grubun (SF+SF) düzeyleri 6. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.041$).

3. 5. grubun (LPS+İVİG) düzeyleri 6. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0.001$).

Kaspaz 3 aktivitesinin gruplararası değerlendirilmesinde:

1. 4. grubun (SF+SF) kaspaz aktivitesi ile 5. grubun (LPS+İVİG) kaspaz aktivitesi arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.47$).
2. 4. grubun (SF+SF) kaspaz aktivitesi 6. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.031$).
3. 5. grubun (LPS+İVİG) kaspaz aktivitesi 6. gruba (LPS+SF) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.013$).



7. ÖZET

İNTRAPERİTONEAL LİPOPOLİSAKKARİT UYGULANAN GEBE RATLARDA, İMMÜNGLOBULİN TEDAVİSİNİN FETAL BEYİNDE GELİŞEN İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

İntrauterin infeksiyon/inflamasyon preterm doğuma neden olduğu bilinen önemli etkenlerin başında gelmektedir. İnfeksiyon/inflamasyona fetal maruziyet, fetal beyin gelişimine hasar veren uzamış nöroinflamatuvar cevap ile sonuçlanmaktadır. Aslında koruyucu bir mekanizma olarak gelişen FIRS, proinflamatuvar sitokinlerin salınışı ile birlikte organ hasarına neden olmaktadır. İVİG'in sitokinler üzerinden etki ederek, inflamatuvar süreçleri engellediği bilinmektedir. Çalışmamızda, gebe ratlara intraperitoneal yoldan verilen LPS'nin beyinde gelişen inflamasyon üzerine olan etkilerinin, intravenöz immünglobulin ile engellenip engellenemediğinin sitokin ve kaspaz düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza 180 yavru rat dahil edildi ve her grup 30 yavru rattan oluşmak üzere 6 gruba ayrıldı. Grup 1 ve Grup 4'ü oluşturacak ratların annelerine gestasyonlarının 19. gününde 0. saatte intraperitoneal yoldan LPS hacmine eşdeğer miktarda SF verildi. Grup 2, 3, 5 ve 6'yı oluşturacak ratların annelerine ise gestasyonların 19. gününde 0. saatte intraperitoneal LPS uygulandı. Grup 1, 3, 4 ve 6'nın annelerine 2. saatte intravenöz SF, Grup 2 ve 5'inkilere İVİG verildi. Grup 1, 2 ve 3'ün annelerine 4. saatte, Grup 4, 5 ve 6'nın annelerine ise 24. saatte histerektomi uygulanarak yavrular doğurtuldu ve beyinler sakrifiye edilerek çıkarıldı.

4. saatte ölçülen TNF- α düzeylerinin gruplararası değerlendirilmesinde, Grup 2 (4.saat LPS+İVİG)'nin TNF- α düzeyleri Grup 1 (4.saat SF+SF) ($p=0.023$) ve Grup 3 e (4.saat LPS+SF) ($p=0.002$) kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu. Grup 1 (4.saat SF+SF)'in düzeyinin de Grup 3 (4.saat LPS+SF)'e kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p=0.003$) [Grup 2 (LPS+İVİG) < Grup 1 (SF+SF) < Grup 3 (LPS+SF)].

4. saatte ölçülen IL-1 β düzeylerinin gruplararası karşılaştırılmasında ise, benzer şekilde, Grup 2 (4.saat LPS+İVİG)'nin IL-1 β düzeylerinin Grup 1 (4.saat SF+SF) ($p<0.001$) ve Grup 3 (4.saat LPS+SF) ($p<0.001$)'e kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Grup 1 (4.saat SF+SF)'e ait düzey de Grup 3 (4.saat LPS+SF)'e kıyasla

anlamli olarak dűşűk bulundu ($p < 0.001$) [Grup 2 (LPS+İVİG) < Grup 1 (SF+SF) < Grup 3 (LPS+SF)].

24. saat gruplarında TNF- α düzeyleri ile ilgili anlamlı bir yorum elde edilemedi. IL-1 β düzeyleri karşılaştırıldığında, Grup 4 (24.saat SF+SF) ve 5 (24.saat LPS+İVİG) arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Ancak hem Grup 4 (24.saat SF+SF) hem de Grup 5 (24.saat LPS+İVİG)'in düzeyleri Grup 6 (24.saat LPS+SF)'a kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (Grup 4 ve Grup 6 için $p:0.041$; Grup 5 ve Grup 6 için $p < 0.001$) [(Grup 4 (24.saat SF+SF) \neq Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) < Grup 6 (24.saat LPS+SF)].

Kaspaz 3 aktivitesinin gruplararası değerlendirilmesinde Grup 4 (24.saat SF+SF) ve Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) arasında anlamlı fark bulunmazken ($p=0.47$), Grup 6 (24.saat LPS+SF)'da kaspaz 3 aktivitesinin Grup 4 (24.saat SF+SF)'e ($p=0.031$) ve Grup 5'e (24.saat LPS+İVİG) ($p=0.013$) kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu saptandı [Grup 4 (24.saat SF+SF) \neq Grup 5 (24.saat LPS+İVİG) < Grup 6 (24.saat LPS+SF)].

Bulgularımız, İVİG'in; beyinde IL-1 β düzeylerini ve kaspaz aktivitesini düşürerek inflamasyonun indüklediği santral sinir sistemi hasarının önlenmesinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: İnflamasyon, LPS, sitokin, İVİG.

8. ABSTRACT

THE EFFECTS OF INTRAVENOUS IMMUNGLOBULIN ON LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED FETAL BRAIN INFLAMMATION

Intrauterine infection / inflammation is one of the known important reasons for preterm birth. Fetal exposure to infection / inflammation results from prolonged neuroinflammatory response in fetal brain damage. Fetal inflammatory response syndrome (FIRS) which actually develops as a protective mechanism, causes organ damage when proinflammatory cytokines are released. It is known that intravenous immunoglobulin (IVIG) acts over cytokines and prevents inflammatory processes. In this study our purpose was to investigate the effects of IVIG on lipopolysaccharide (LPS) induced brain inflammation in neonates by determining cytokine levels and caspase activity.

180 infant rats were included and they were divided into 6 groups of 30 rats each. The mothers of Group 1 and 4 rats were administered SF, intraperitoneally at 0 hour, equal to the LPS volume, on the 19th day of their gestation. Mothers of Groups 2, 3, 5, 6 were given LPS intraperitoneally at 0 hour on the 19th day of their gestation. Two hours after LPS or SF administration, intravenous SF was given to Group 1, 3, 4, 6 mothers and IVIG to Group 2 and 5 mothers. Hysterectomy was performed in Group 1, 2, 3 mothers at 4th hour and Group 4, 5, 6 mothers at 24th hour and the babies were given birth and the brains were extracted.

In 4th hour Groups, TNF- α levels of Group 2 (4th hour LPS+IVIG) were significantly lower than the levels of Group 1 (4th hour SF+SF) ($p=0.023$) and Group 3 (4th hour LPS+SF) ($p:0.002$). The levels of Group 1 (4th hour SF+SF) were also significantly lower than the levels of Group 3 (4th hour LPS+SF) ($p:0.003$) [Group 2 (LPS+IVIG) < Group 1 (SF+SF) < Group 3 (LPS+SF)].

Similarly, in 4th hour Groups, IL-1 β levels of Group 2 (4th hour LPS+IVIG) were significantly lower than the levels of Group 1 (4th hour SF+SF) ($p<0.001$) and Group 3 (4th hour LPS+SF) ($p<0.001$). The levels of Group 1 (4th hour LPS+IVIG) were also significantly lower than the levels of Group 3 (4th hour LPS+SF) ($p<0.001$) [Group 2 (LPS+IVIG) < Group 1 (SF+SF) < Group 3 (LPS+SF)].

In 24th hour Groups; no conclusion could be obtained with TNF- α levels. The difference between IL-1 β levels of Group 4 (24th hour SF+SF) and Group 5 (24th hour LPS+IVIG) were insignificant but, both of them were significantly lower than the levels of Group 6 (24th hour LPS+SF) (p=0.041 for Groups 4 and 6; p<0.001 for Groups 5 and 6) [(Group 5 (24th hour LPS+IVIG) \neq Group 4 (24th hour SF+SF) < Group 6 (24th hour LPS+SF)].

No significant difference was detected between caspase 3 activity levels of Group 4 (24th hour SF+SF) and Group 5 (24th hour LPS+IVIG) (p=0.47). However caspase 3 activity level of Group 6 (24th hour LPS+SF) was significantly higher than the activity levels of Group 4 (24th hour SF+SF) (p=0.031) and Group 5 (24th hour LPS+IVIG) (p=0.013) [Group 4 (24th hour SF+SF) \neq Group 5 (24th hour LPS+IVIG) < Group 6 (24th hour LPS+SF)].

Our results suggest that, IVIG; may be effective in the prevention of central nervous system damage, induced by inflammation, by decreasing IL-1 β levels and caspase 3 activity in brain tissue.

Keywords: Inflammation, LPS, cytokine, IVIG.

9. KAYNAKLAR

- 1) Colford JM, Yvonne M. Chorioamnionitis as a Risk Factor for Cerebral Palsy: A Meta Analysis. *The Journal of the American Medical Association* 2000; 284: 1417-24.
- 2) Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 194-202.
- 3) Ajayi-Obe M, Saeed N, Cowan FM, Rutherford MA, Edwards AD. Reduced development of cerebral cortex in extremely premature infants. *Lancet* 2000; 356: 1162-63.
- 4) Ning H, Wang H, Zhao L, Zhang C, Li XY, Chen YH, et al. Maternally administered LPS increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and fetal brain: Its suppression by low dose pretreatment. *Toxicology Letters* 2008; 176: 13-19.
- 5) Wang X, Hagberg H, Zhu C, Jacobsson B, Mallard C. Effects of intrauterine Inflammation on the developing mouse brain. *Brain Research II* 2007; 1144: 180-5.
- 6) Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PH. Differential roles of tumor necrosis factor and interleukin 1 β lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res* 2003; 975: 37-47.
- 7) Pang Y, Cai Z, Rhodes PH. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Dev Brain Res* 2003; 140: 205-4.
- 8) Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 343-53.
- 9) Sharangpani A, Takanohashi A, Bell MJ. Caspase activation in fetal rat brain following experimental intrauterine inflammation. *Brain Res II* 2008; 1200: 138-45.
- 10) Cai Z, Pan ZL, Yi E, Owen B, Rhodes PG. Cytokine induction fetal rat brains and brain injury in neonatal rat after maternal lipopolysaccharide administration. *International Pediatrics Research Foundation* 2000; 47(1): 64-76.
- 11) Lamont RF, Duncan SL, Mandal D, Bassett P. Intravaginal clindamycin to reduce preterm birth in women with abnormal genital tract flora. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 516-2.
- 12) Hannah M. Antibiotics for preterm prelabour rupture of membranes and preterm labour. *Lancet* 2001; 357: 973-4.
- 13) Pierrat V, Duquennoy C, Van Haastert IC, Ernst M, Guilley N, De Vries LS. Ultrasound diagnosis and neurodevelopmental outcome of localised and extensive cystic periventricular leucomalacia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2001; 84: 151-6.
- 14) Amran D, Renz H, Lack G, Brandley K, Gelfand EW. Suppression of cytokine dependent human T cell proliferation by intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 180-6.

- 15) Aukrust P, Froland SS, Liabakk NB, Muller F, Nordoy I, Haug C, et al. Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Blood* 1994; 84: 2136-43.
- 16) Bayry J, Misra N, Latry V, Prost F, Delignat S, Lacroix-Desmazes S. Mechanism of action of immunoglobulin. *Transfus Clin Biol* 2003; 10: 165-9.
- 17) Semole W, Crow AR, Lazarus AH, Freedman J, Garvey MB. Intravenous immunoglobulin products: an update on their mechanism of action. *J ISBT Science Series* 2008; 152-8.
- 18) Thiruma. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS* 2007; 104: 14104-9.
- 19) Reuben S, Sumi MG, Mathai A, Nair MD, Radhakrishnan VV. Intravenous immunoglobulin reduces serum tumor necrosis factor α in patients with Guillan Barre Syndrome. *Neurol India* 2003;51: 487-9.
- 20) Bayry J, Thirion M, Misra M, Thorenoor N, Delignat S, Lacroix-Desmazes S, et al. Mechanism of Action of Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Neurol Sci* 2003; 24: 217-1.
- 21) Saji F, Samejima Y, Kamiura S. Cytokine Production in chorioamnionitis. *J Repord Immunol* 2000;47: 185-96.
- 22) Özdemir A, Mark A, Wayne JM. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23: 292-306.
- 23) Kauma SW, Matt D, Strom S, Eirman D, Turner T. Interleukin 1β , human leukocyte antigen HLA-DR and transforming growth factor β expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 153: 1430-7.
- 24) Mitchell M, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta* 1993; 192: 189-90.
- 25) Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL- 1β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 163: 1430-7.
- 26) Eades DK, Corneum P and Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988; 9; 247-51.
- 27) Barone FC, Arvin RF, White BS, Miller CL, Webb MS, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor α , a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28: 1231-44.
- 28) Damman O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res* 1997; 42; 1-8.
- 29) Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 174: 1855-62.
- 30) Brown NI, Alvi SA, Elder MG, Bennet PR, Sullivan Mh. Regulation of prostaglandin production in intact fetal membranes by interleukin 1 and its receptor antagonist. *J Endocrinol* 1998; 159; 519-26.

- 31) Ng PC, Li K, Wong RP, Chui K, Wong E, Li G. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88: 209-13.
- 32) Leviton A, Allred EN, Kuban KC, Hecht JL, Onderdonk AB, O'Shea TM, Paneth N. Microbiologic and histologic characteristics of the extremely preterm infant's placenta predict white matter damage and later cerebral palsy. The ELGAN study. *Pediatr Res* 2010; 67: 95-101.
- 33) Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001; 56: 1278-84.
- 34) Kültürsay N. Fetal ve neonatal proinflamatuvar sitokin yanıtının perinatal beyin ve akciğer zedelenmesi ile ilişkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg* 2003; 46: 299-307.
- 35) Viscardi RM, Muhumuza CK, Rodriguez A. Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants. *Pediatr Res* 2004; 55: 1009-17.
- 36) Knox IC Jr, Hoerner JK. The role of infection in premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1950;59: 190-4.
- 37) Bobitt JR, Ledger WJ. Unrecognized amnionitis and prematurity: a preliminary report. *J Reprod Med* 1977; 19: 8-12.
- 38) Sheurman MP, Otsuki K. Maternal Chorioamnionitis. *J Pediatr* 2009; 110: 35-9.
- 39) Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 2002; 7: 259-67.
- 40) Romero R, Chaiworapongsa T, Gervasi MT. Fetal and maternal responses to intrauterine infection. *Fetal and Neonatal Physiology* 2003; 3: 131-42.
- 41) Wenstrom KD, Andrews WW, Hauth JC. Elevated second trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:546-50.
- 42) Cornette L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004; 9: 459-70.
- 43) Rezaie P, Dean A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology* 2002; 22: 106-9.
- 44) Ugwumadu A. Infection and fetal neurologic injury. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18: 106-11.
- 45) Yoon BH, Romero R, Park JS. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(3): 675-81.
- 46) Leviton A, Gilles F, Neff R, Yaney P. Multivariate analysis of risk of perinatal telencephalic leucoencephalopathy. *Am J Epidemiol* 1976; 104: 621-6.

- 47) Gilles FH, Averill DR, Kerr CS. Neonatal endotoxin encephalopathy. *Ann Neurol* 1977; 2: 49–56.
- 48) Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S. The toll-like receptorTLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyteinjury in the CNS. *J Neurosc* 2002; 22: 2478-86.
- 49) Dammann O, Leviton A. Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol* 1998;5: 190–201.
- 50) Back SA, Rivkees SA. Emerging concepts in periventricularwhite matter injury. *Semin Perinatol* 2004; 28: 405-14.
- 51) Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 2008; 28: 2320–31.
- 52) Fan LW, Mitchell HJ, Rhodes PG, Cai Z. 2008 Alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitrone attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 2008; 151: 737–44.
- 53) Beutler B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257–63.
- 54) Palsson-McDermott EM, O’Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113: 153.
- 55) Hagberg H, Mallard C. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 117–23.
- 56) Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 379–90.
- 57) Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM, Saunders NR. Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol* 2003; 460: 451-64.
- 58) Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 422-7.
- 59) Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent SR. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Exp Neurol* 2004; 190: 446–55.
- 60) Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J* 2001; 15: 155–63.
- 61) Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 216–27.
- 62) Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 2003; 17: 13-9.

- 63) Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* 2004; 18: 407–13.
- 64) Fang C, Yoon S, Tindberg N. Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1389–97.
- 65) Kopp EB, Medzhitov R. The toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 13-8.
- 66) Hosoi T, Okuma Y, Kawagishi T. Bacterial endotoxin induces STAT-3 activation in the mouse brain. *Brain Res* 2004; 1023: 48-53.
- 67) Duncan JR, Cock ML, Scheerlinck JP. White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus. *Pediatr Res* 2002; 52: 941-9.
- 68) Mallard C, Welin AK, Peebles D. White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep. *Neurochem Res* 2003; 28: 215-23.
- 69) Debillon T, Gras-Leguen C, Leroy S. Patterns of cerebral inflammatory response in a rabbit model of intrauterine infection-mediated brain lesion. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 145: 39-48.
- 70) Krizanac-Bengez L, Mayberg MR, Cunningham E. Loss of shear stress induces leukocyte-mediated cytokine release and model. *J Cell Physiol* 2006; 206: 68-77.
- 71) Willis CL, Davis TP. Chronic inflammatory pain and the neurovascular unit: a central role for glia in maintaining BBB integrity? *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1625-43.
- 72) Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-8.
- 73) Dammann O, Durum S, Leviton A. Do white cells matter in white matter damage? *Trends in Neurosciences* 2001; 24: 320-4.
- 74) Chao CC, Hu S, Ehrlich L. Interleukin-1 and TNF- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of NMDA receptors. *Brain Behav Immun* 1995; 9: 355–67.
- 75) Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T. Interleukin-1 induces a shock like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988; 81: 1162–72.
- 76) Stolp H, Dziegielewska K. Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35: 132-46.
- 77) Megyeri P, Abraham CS, Temesvari P. Recombinant human tumornecrosisfactor-alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain-barrierpermeability in newborn piglets. *Neurosci Lett* 1992; 148: 137–40.
- 78) Yoon BH, Romero R, Kim CJ. High expression of tumor necrosisfactor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 406-11.

- 79) Yoon BH, Jun JK, Romero R. Amniotic fluid inflammatory cytokines interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α , neonatal brain white matter lesions and cerebralpalsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 19–26.
- 80) Duggan PJ, Maalouf EF, Watts TL, Sullivan MH, Counsell SJ, Allsop J, et al. Intrauterin T cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet* 2001; 358: 1699-700.
- 81) Folkerth RD, Keefe RJ, Haynes RL, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC. Interferon-gamma expression in periventricular leukomalacia in the human brain. *Brain Pathol* 2004; 14: 265-74.
- 82) Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res* 1998; 23: 329-40.
- 83) Bona E, Andersson AL, Blomgren K. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 1999; 45: 500–9.
- 84) Huleihel M, Golan H and Hallak M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: Possible mechanisms involved. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 2-17.
- 85) Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms and prevention. *J Neurosci* 1993; 13: 1441–53.
- 86) Back SA, Gan X, Li Y. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998; 18: 6241–53.
- 87) Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 2001; 24: 169-81.
- 88) Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 2004; 251: 1304-16.
- 89) Winter CD, Pringle AK, Clough GF, Church MK. Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury. *Brain* 2004; 315-20.
- 90) Blumenthal I. Periventricular leucomalacia: a review. *Eur J Pediatr* 2004; 163: 435–42.
- 91) Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W. ORACLE Collaborative Group. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. *Lancet* 2001; 357: 979-88.
- 92) Nitsos I, Rees SM, Duncan J. Chronic exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide affects the ovine fetal brain. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 239–47.
- 93) Greisen G. Cerebral blood flow in preterm infants during the first week of life. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 43–51.
- 94) Ilan A, Zivanit E. Fetal inflammatory response and associated infant morbidity. *IMAJ* 2004; 6: 766-9.

- 95) Kelen D, Robertson NJ. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Human Development* 2010; 86: 369-77.
- 96) Fan X, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, Bel FV. Pharmacological Neuroprotection after Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury *Curr Neuropharmacol* 2010; 8: 324-34.
- 97) Ji Z, Guo X, Hong X, Simbruner G, Blomgren K, Zhu CZ. Erythropoietin Improved Neurologic Outcomes in Newborns With hypoxic ischemic encephalopathy *Pediatrics* 2009; 124: 218-26.
- 98) Yeşilirmak DC, Kumral A, Baskın H, Ergür BU, Aykan S, Genç S. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain. *Brain Res* 2007; 1164: 14-23.
- 99) Rossi F, Jayne DR, Lockwood CM, Kazathckine MD. Anti-idiotypes against anti-neutrophil cytoplasmic antigen autoantibodies in normal human polyspecific IgG for therapeutic use and in the remission sera of patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1991; 83: 298-303.
- 100) Shoefeld Y. Idiotypic induction of autoimmunity: a new aspect of the idiotypic network. *FASEB J* 1994; 8: 1296-301.
- 101) Sultan Y, Rossi F, Kazathckine MD. Recovery from anti-VIIIc (anti-hemophilic factor) autoimmune disease is dependent on generation of anti-idiotypes against anti-VIIIc autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 828-31.
- 102) Andersson U, Skansen SU, Andersson JP. Pooled human IgG modulates cytokine production in lymphocytes and monocytes. *Immunol Rev* 1994; 139(21): 21-42.
- 103) Basta M, Fries LF, Frank MM. High dose intravenous immunoglobulin inhibits in vitro uptake of C4 fragments onto sensitized erythrocytes. *Blood* 1991; 77: 326-7.
- 104) Basta M, Dalakas MC. High dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effects in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complements fragments. *J Clin Invest* 1994; 94: 1729-35.
- 105) Swift AJ, Collins TS, Bugelski P, Winkelstein CA. Soluble human complement receptor type I inhibits complement-mediated host defense. *Clin Diag Lab Immunol* 1994; 1: 585-9.
- 106) Couser WG, Johnson RJ, Young BA, Yeh CG, Toth CA, Rudolph AR. The effects of soluble recombinant complement receptor I on complement-mediated experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1888-94.
- 107) Dalakas MC. Mechanism of action of intravenous immunoglobulin and therapeutic considerations in the treatment of autoimmune neurologic diseases. *Neurology* 1998; 51: 2-8.
- 108) Soderstorm T, Soderstorm R, Enskog A. Immunoglobulin subclasses and prophylactic use of immunoglobulin in immunoglobulin G subclass deficiency. *Cancer* 1991; 68: 1426-9.
- 109) Mannhalter JW, Eibl MM. Down regulation of Fc receptors by IVIG. *Int Rev Immunol* 1989; 5: 173-9.

- 110) Mannhalter JW, Ahmad R, Wolf HM, Eibl MM. Effect of polymeric IgG on monocyte functions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 159-64.
- 111) Blaszyk R, Westhoff U, Grosswilde. Soluble CD4, CD8, and HLA molecules in commercial immunoglobulin preparations. *Lancet* 1993; 341: 789-90.
- 112) Svenson M, Hansen MB, Ross C, Diamant M, Rieneck K, Nielsen H, et al. Antibody to granulocyte-macrophage colony stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in Human IgG preparations. *Blood* 1998; 91: 2054-61.
- 113) Bendzen K, Hansen MB, Ross C, Svenson M. High avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol* 1998; 19: 209-11.
- 114) Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Caubonneil C, Misra N, Donkava V, Pashov A, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* 2003; 101: 758-65.
- 115) Dwyer JM. Thirty years of supplying the missing link. History of gammaglobulin therapy for immunodeficient states. *Am J Med* 1984; 76: 46-52.
- 116) Nolte MT, Pirofsky B, Gerritz GA, Golding B. Intravenous immunoglobulin therapy for antibody deficiency. *Clin Exp Immunol* 1979; 36: 237-43.
- 117) Maleckiene L, Nadisauskiene R, Stankeviciene I. A case-referent study on fetal bacteremia and late fetal death of unknown etiology in Lithuania. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 1069-74.
- 118) Tolockiene E, Morsing E, Holst E. Intrauterine infection may be a major cause of stillbirth in Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80: 511-8.
- 119) Blackwell S, Romero R, Chaoworapongsa T. Maternal and fetal inflammatory responses in unexplained fetal death. *J Matern-Fetal Med* 2003; 14: 151-7.
- 120) Moyo SR, Hagerstrand I, Nystrom L. Stillbirths and intrauterine infection, histologic chorioamnionitis and microbiological findings. *Int J Gynecol Obstet* 1996; 54: 115-23.
- 121) Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J. Amniotic fluid infection, cytokines and adverse outcome among infants at 34 week gestation or less. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 1080-8.
- 122) Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. Intraamniotic infection in low birth weight infants. *J Infect Dis* 1988; 157: 113-7.
- 123) Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res* 2004; 56: 541-6.
- 124) Golan Hm, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005; 48: 903-17.
- 125) Deguchi K, Oguchi K, Takashima S. Characteristic neuropathology of leukomalacia in extremely low birth weight infants. *Pediatr Neurol* 1997; 16: 296-300.

- 126) Ruiz-de-Souza V, Carreno M, Kaveri S, Kazatchikine MD. Selective induction of IL-1ra and IL-8 in human monocytes by normal polyspecific immunoglobulin G for the therapeutic use. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1267-73.
- 127) Andersson UG, Bjork L, Skansen-Saphir U, Andersson JP. Downregulation of cytokine production and IL-2 receptor expression by pooled human IgG. *Immunology* 1993; 79: 211-6.
- 128) Patrick LA, Gaudet LM, Farley AE, Rossiter JP, Tomalty LL, Smith GN. Development of a guinea pig model of chorioamnionitis and fetal brain injury. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1205-11.
- 129) Nortington FJ, Ferriero DM, Martin LJ. Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell-death. *Dev Neurosci* 2001; 23: 186-219.
- 130) Arumugam TV, Tang SC, Lathia JD, Cheng A, Mughal MR, Chigurupati S, et al. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *PNAS* 2007; 104(35): 14104-9.
- 131) Gravett MG, Sadowsky D, Witkin M. Immunomodulators plus antibiotics to prevent preterm delivery in experimental intra-amniotic infection (IAI). *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 56.
- 132) Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 476-80.
- 133) Mesples B, Plaisant F, Gressens P. Effects of interleukin-10 on neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 141(1-2): 25-32.
- 134) Cherian S, Thoresen M, Silver IA. Transforming growth factor-beta s in a rat model of neonatal posthaemorrhagic hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 585-600.
- 135) Heep A, Stoffel-Wagner B, Bartmann P. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta 1 are highly expressed in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Pediatr Res* 2004; 56(5): 768-74.
- 136) Basu A, Krady JK, Enterline JR. Transforming growth factor beta 1 prevents IL-1 beta-induced microglial activation, whereas TNF alpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia* 2002; 40: 109-20.
- 137) Guan J, Miller OT, Waugh KM. TGF beta-I and neurological function after hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuroreport* 2004; 15: 961-4.
- 138) Kumral A, Baskin H, Yeşilirmak DC, Ergür BU, Aykan S. Erythropoietin attenuates LPS induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 2007; 92: 269-78.
- 139) Elimian A, Verma U, Beneck D, Cipriano R, Visintainer P, Tejani N. Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 333-6.

- 140) Been JV, Rours IG, Kornelisse RF, Lima Passos V, Kramer BW, Schneider TA, et al. Histologic chorioamnionitis, fetal involvement, and antenatal steroids: effects on neonatal outcome in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 581–8.
- 141) Kent A, Lomas F, Hurrión E, Dahlstrom JE. Antenatal steroids may reduce adverse neurological outcome following chorioamnionitis: neurodevelopmental outcome and chorioamnionitis in premature infants. *J Paediatr Child Health* 2005; 41: 186–90.
- 142) Dammann O, Leviton A. Brain Damage in Preterm Newborns: Might enhancement of developmentally regulated endogenous protection open a door for prevention? *Pediatrics* 1999; 104: 541-50.
- 143) Romero R, Chaiwaporongsa T, Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infections preterm birth and fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr* 2003; 133: 1668-73.
- 144) Azzopardi D, Brocchust P, Edwards D. The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC Pediatr* 2008; 30: 8-17.
- 145) Kimberly RP, Salmon JE, Bussel JB, Crow MK, Hilgartner MW. Modulation of mononuclear phagocyte functions by intravenous gamma globulin. *J Immunol* 1984; 132: 745-50.
- 146) Fehr J, Hoffman V, Kappener U. Transient reversal of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura by high dose intravenous gammaglobulin. *N Engl J Med* 1982; 306: 1254-8.
- 147) Park-Min KH, Serbina NV, Yang W, Max-Krystal G, Neel BG, Nutt SL, et al. *Immunity* 2007; 26: 67-78.
- 148) Leung D, Kurt –Jones E, Newburger J. Endothelial cell activation of high interleukin 1 secretion in the pathogenesis of acute Kawasaki disease. *Lancet* 1989: 1298-302.
- 149) Arend WP, Smith MF, Jonson RW, Joslin FG. IL-1 receptor antagonist and IL-1 β production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 1991; 147: 1530-6.
- 150) Li N, Zhao M, Hilario – Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, et al. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 3440-50.
- 151) Campbell DE, Georgiou GM, Kemp AS. Pooled human immunoglobulin inhibits IL-4 but not IFN- γ or TNF- α secretion following in vitro stimulation of mononuclear cells. *Cytokine* 1999; 359-65.