

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

**RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU TANISI ALAN PREMATÜRE
BEBEKLERİN KAN PLAZMA ÖRNEKLERİNDE CRP, IL6, FİBRİNOJEN, ALFA
1 ANTİKİMOTRİPSİN VE ALFA 1 ANTİPROTEİNAZ DÜZEYLERİNİN
RDS ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİ**

Ahmet Öktem

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Duygu Özel Demiralp

Temmuz

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ahmet Öktem

ÖZET

Doktora Tezi

Respiratuvar Distres Sendromu Tanısı Alan Prematüre Bebeklerin Kan Plazma Örneklerinde CRP, IL6, Fibrinojen, Alfa 1 Antikimotripsin ve Alfa 1 Antiproteinaz Düzeylerinin RDS Şiddeti İle İlişkisi

Ahmet Öktem

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. F. Duygu Özel Demiralp

Respiratuvar distres sendromu (RDS) prematüre bebeklerde, surfaktan eksikliğine bağlı gelişen bir hastalıktır. Hastalarda morbidite ve mortaliteyi arttıran bir nedendir. Respiratuvar distres azalan kompiyans ve pulmoner ödemele karakterizedir. Bu değişiklikler alveollerde kollapsa neden olur. Böylece alveoller düzeyde gaz değişimi bozulur. Doğumdan hemen sonra alveolar epitelyum hücrelerinde nekroz gelişir ve bu hücrelerin yerinde hiyalen membranlar oluşmaya başlar. Dilate hava yollarını çepeçevre saran hiyalen membranlar, hasarlı epitelyum ve kapillerlerden akciğer yüzeyine sızan plazma proteinlerinin koagülasyonu sonucu ortaya çıkar. Surfaktan eksikliği ile birlikte ortaya çıkan enflamatuvar yanıt sendromu, patolojik bulguların gelişmesine yol açan en önemli nedenlerden birisidir. Çok düşük doğum ağırlıklı (gebelik haftası <32 hafta ve/veya doğum ağırlığı <1500 gram) 59 prematüre bebeğin alındığı çalışmada 30 bebek surfaktan tedavisi almıştır. Surfaktan tedavisi alan bebeklerin, tedavi öncesi CRP, IL-6, fibrinojen, alfa-1 antikimotripsin ve alfa-1 antitripsin düzeyleri ile tedavi sonrası düzeyleri ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Alfa-1 antikimotripsin ve alfa-1 antitripsin nötrofil proteazları inhibe eden proteaz inhibitörleridir. Bu çalışmada alfa-1 antikimotripsin ve alfa-1 antitripsin plazma düzeylerindeki değişimler western blot deneyleri ile gösterilmiştir. Bu çalışmada alfa-1 antitripsin düzeyinin RDS'li hastalarda surfaktan tedavisi öncesi düşük olduğu, surfaktan tedavisi sonrası yükseldiği görülmüştür. Bu durum akut faz reaktanı olan alfa-1 antitripsinin enflamasyon sırasında yükselmesine karşın proteaz inhibitörü olmasından dolayı hızla tüketildiğini ve surfaktan tedavisi sonrasında tekrar yükselişe geçtiğini göstermektedir. Böylece enflamasyon bölgesindeki kronik hasarı önlemekte parankimin zarar görmesini engellemektedir. Western blot deneylerinde alfa-1 antikimotripsin'in 65 kDA'luk alt ünitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bu alt ünite akut faz reaktanı olarak değerlendirilecek olursa fibrinojen pikinden daha geç cevap veren bir akut faz protein ünitesi olabileceği düşünülmektedir. Akut enflamasyon sırasında hızla tüketilen bir proteaz inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Bu çalışmada, alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsinin surfaktan tedavisi ile kan plazma örneklerindeki değişimi ile birlikte bu proteinlerin hasta prognozu ve tekrarlayan surfaktan ihtiyacı ile ilişkisi gösterilmiştir.

2021, 91 sayfa

Anahtar kelimeler: Prematüre, respiratuvar distres sendromu, alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsinin, surfaktan.

ABSTRACT

PhD Thesis

The Relationship Between Respiratory Distress Syndrome Intensity and CRP, IL6, Fibrinogen, Alpha-1 Antichymotrypsin, Alpha-1 Antiproteinase Levels in Blood Plasma Samples of Preterm Babies with Respiratory Distress Syndrome

Ahmet Öktem

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. F. Duygu Özel Demiralp

Respiratory distress syndrome (RDS) is a disease that develops in premature babies due to surfactant deficiency. It is a cause that increases morbidity and mortality in patients. Respiratory distress is characterized by decreased lung compliance and pulmonary edema. These changes cause collapse in the alveoli. So gas exchange at the alveolar level has disrupted. It is the necrosis of alveolar epithelium cells that occurs within the first half hour after birth and hyaline membranes replace instead of epithelial cells detached from the basement membrane. Coagulation of plasma proteins leaking from damaged capillar epithelium to the lung surface creates hyaline membranes surrounding the airways. Inflammatory response syndrome occurring with surfactant deficiency is one of the reasons leading to the development of pathological findings. 59 premature babies with very low birth weight (gestational week <32 weeks and / or birth weight <1500 grams) were included in this study and 30 of the babies received surfactant treatment. The pre-treatment CRP, IL-6, fibrinogen, alpha-1 antichymotrypsin and alpha-1 antitrypsin levels of babies who received surfactant treatment were compared with the post-treatment levels and the control group. Alpha-1 antichymotrypsin and alpha-1 antitrypsin are protease inhibitors that inhibit neutrophil proteases. In this study, changes in alpha-1 antichymotrypsin and alpha-1 antitrypsin plasma levels were demonstrated by western blot experiments. In this study, it was observed that alpha-1 antitrypsin level was low in patients with RDS before surfactant treatment and increased after surfactant treatment. This indicates that alpha-1 antitrypsin, which is an acute phase reactant, increases during inflammation, although it is consumed rapidly due to its protease inhibitor status and it increases again after surfactant treatment. Alpha-1 antitrypsin prevents chronic damage in the inflammation area and thus prevents damage of the lung parenchyma. A decrease in the 65 kDA subunit of alpha-1 antichymotrypsin was observed in western blot experiments. If this subunit is considered as an acute phase reactant, it may be an acute phase protein unit that responds later than the fibrinogen peak. It acts as a protease inhibitor that is quickly depleted during acute inflammation. In this study, the change in blood plasma samples of alpha-1 antitrypsin and alpha-1 antichymotrypsin with surfactant treatment and its relation with the patient's prognosis and recurrent surfactant requirement was shown.

2021, 91 pages

Keywords: Preterm, respiratory distress syndrome, alpha-1 antitrypsin, alpha-1 antichymotrypsin, surfactant.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam, sayın Prof. Dr. F. Duygu Özel Demiralp'e,

Bu doktora programına katılmam ve eğitimimi tamamlama sürecinde değerli destek ve tecrübelerini esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Nejat Akar'a,

Ayrıca kıymetli zamanlarını benim hazırladığım bitirme projesine ayırıp değerlendirdikleri için ve bu dönemde bana kattıkları her bilgi için sayın Prof. Dr. Fikret Şahin, Prof. Dr. Erkan Yurtçu ve Dr. Öğr. Üyesi Doruk Engin'e,

Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve deneylerim sırasında desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Dr. Beycan Ayhan ve Dr. Seçil Karahisar Turan'a, öğrenci işleri koordinatörü Asuman Erzincan'a,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki eğitim sürecinde değerli bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, başta enstitü müdürümüz sayın Prof. Dr. Aykut Özkul ve enstitü müdür yardımcımız Prof. Dr. Hilal Özdağ olmak üzere tüm değerli hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. RESPİRATUVAR DİSTRES SENDROMU(RDS)	3
2.1.1. FİZYOLOGİ.....	3
2.1.2. KLİNİK BULGULAR	10
2.1.3. RESPİRATUVAR DİSTRES SENDROMU TEDAVİSİNDE SURFAKTAN KULLANIMININ BİYOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ	12
3. GEREKÇE VE AMAC.....	27
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
4.1. MATERYAL	28
4.2. YÖNTEM.....	29
4.2.1. TAM KAN SAYIMI VE FİBRİNOJEN, IL-6, CRP İFADE ANALİZLERİ	29
4.2.1.1. Tam Kan Sayımı ve Periferik Yayma Hazırlanması:	29
4.2.1.2. Fibrinojen test yöntemi (Clauss Yöntemi):.....	31

4.2.1.3. IL-6 test yöntemi:.....	32
4.2.1.4. CRP test yöntemi (Nefelometrik Yöntem):	33
4.2.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ	33
4.2.3. WESTERN BLOTLAMA.....	34
4.2.3.1. SDS PAGE Hazırlama Protokol:	34
4.2.3.2. Jellere yüklenecek örneklerin hazırlanması	35
4.2.3.3. Western Blot transfer protokolü.....	35
4.2.4. ALFA-1 ANTİTRİPSİN VE ALFA-1 ANTİKİMOTRİPSİN PROTEİNLERİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE ANALİZ PROTOKOLÜ	36
4.2.5. İSTATİSTİK ANALİZİ	38
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>39</u>
5.1. TAM KAN SAYIMI VE FİBRİNOJEN, IL-6 VE CRP İFADELERİNE AİT BULGULAR	39
5.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ BULGULARI.....	45
5.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	45
5.4. ALFA-1 ANTİTRİPSİN VE ALFA-1 ANTİKİMOTRİPSİN PROTEİNLERİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE ANALİZ BULGULARI.....	48
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>53</u>
6.1. TARTIŞMA	53
6.2. SONUÇ.....	61
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>63</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>75</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Alveolar kollaps halinde, açık hava yollarında hyalen membranlar (7).	4
Şekil 2. 2. Sürfaktanın morfolojik yapısı(8, 10).....	5
Şekil 2. 3. Respiratuvar distres sendromu patofizyolojisi ve klinik bulguların özeti (17, 21).....	7
Şekil 2. 4. Alveol-kan bariyeri (20).....	8
Şekil 2. 5. RDS akciğer grafisi bulguları. Alveoller havalanmadığı için normalde siyah görülmesi gereken akciğer alanı beyaz renkli görünmekte (Buzlu cam görüntüsü) (25)....	12
Şekil 2. 6. Alfa-1 antitripsinin şematik yapısı(72).	21
Şekil 2. 7. Elaestaz-AAT kompleksinin şematik yapısı (75).	22
Şekil 2. 8. Alfa-1 antikimotripsinin şematik yapısı (100, 102).	25
Şekil 5. 1. Sürfaktan alan grup ile surfaktan almayan grubun (a) I/T oranları dağılımı, (b) CRP değerleri dağılımı, (c) IL-6 değerleri dağılımı.	42
Şekil 5. 2. Sürfaktan alan grup ile surfaktan almayan grupta I/T oranı 0,2 üzerinde olan vakaların dağılımı (a), CRP değeri 8 mg/L üzerinde olan vakaların dağılımı (b), IL-6 değeri 23 pg/mL üzerinde olan vakaların dağılımı (c), fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde	43
Şekil 5. 3. RDS şiddetindeki artış ile I/T oranındaki değişim (a), CRP değerlerindeki değişim (b), IL-6 değerlerindeki değişim (c), fibrinojen değerlerindeki değişim (d).	44
Şekil 5. 4. Alfa-1 antitripsin ve β-aktin proteinlerinin gruplar arasındaki ifade farklılıklarınınin western blot görüntüsü ile gösterilmesi.....	46
Şekil 5. 5. Alfa-1 antikimotripsinin western blot görüntüsü. ve β-aktin proteinlerinin gruplar arasındaki ifade farklılıklarınınin western blot ile gösterilmesi.....	47

Şekil 5. 6. Surfaktan tedavisi ile birlikte hastalardaki alfa-1 antitripsinin düzeyinin dağılımı.....	48
Şekil 5. 7. Alfa-1 antitripsinin surfaktan tedavisi ile birlikte gruplar arasındaki değişimi. 49	
Şekil 5. 8. Surfaktan tedavisi ile birlikte hastalardaki alfa-1 antikimotripsinin düzeyinin dağılımı.....	49
Şekil 5. 9. Alfa-1 antikimotripsinin surfaktan tedavisi ile birlikte gruplar arasındaki değişimi	50
Şekil 5. 10. Çalışmada gruplar arası ifade farklılıkları incelenen proteinlerin PANTHER ve STRING veri tabanları ile değerlendirilmesi.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Surfaktan proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları(7,8).	6
Çizelge 2. 2. RDS gelişme riskini arttıran ve azaltan faktörler (13,14).	9
Çizelge2. 3. Pozitif akut faz reaktanları ve negatif akut faz reaktanları (50-53).	17
Çizelge 5. 1. Gruplar arası doğum kilosu, gebelik haftası ve anne yaşı karşılaştırması.	39
Çizelge 5. 2. Gruplar arası perinatal risk faktörlerinin karşılaştırılması.	40
Çizelge 5. 3. Gruplar arası tam kan sayımı değerlerinin karşılaştırılması.	41
Çizelge 5. 4. Surfaktan alan vakalarda surfaktan tedavisi sayısı arttıkça (RDS şiddeti arttıkça) I/T oranı, CRP, IL-6 ve fibrinojen değerlerinin değişimi.	44
Çizelge 5. 5. Deney gruplarına ait protein miktarları.....	45
Çizelge 5. 6. Surfaktan alan vakalarda surfaktan tedavisi ile alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin plazma düzeylerinin değişimi (ELISA deneyleri)	50
Çizelge 5. 7. Surfaktan almayan vakalarda alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin plazma düzeylerinin değişimi (ELISA deneyleri)	51
Çizelge 5. 8. Çalışmada ifade farklılıkları araştırılan alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsin, interlökin-6, CRP, fibrinojen proteinlerinin STRING (Version 11.5) veri tabanına göre ilişkili olduğu yollar ve tanımları.....	52

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
BPD	Bronkopulmoner Displazi
CRP	C-Reaktif Protein
IL	İnterlökin
IUGR	İntrauterin Büyüme Geriliği
İVK	İntraventriküler Kanama
KAH	Kronik Akciğer Hastalığı
kDA	Kilodalton
RDS	Respiratuvar Distres Sendromu
ROP	Prematüre Retinopatisi
SP-A	Surfaktan Protein A
SP-B	Surfaktan Protein B
SP-C	Surfaktan Protein C
SP-D	Surfaktan Protein D
TNF	Tümör Nekrozis Faktör

1. GİRİŞ

Respiratuvar distres sendromu (RDS) prematüre bebeklerin, surfaktan eksikliğine bağlı gelişen bir hastalıdır. Prematüre bebeklerde morbidite ve mortaliteyi arttırır. Respiratuvar distresde pulmoner kompliyans azalır ve pulmoner ödemle karakterizedir. Bu değışiklikler alveollerde kollapsa neden olur. Böylece alveoller düzeyde gaz değışimi bozulur.

RDS genel olarak bir hastalık değil prematür doğum ile ilişkili bir gelişim bozukluğudur. Akciğerlerde surfaktan üretiminde azalma ile birlikte akciğerin morfolojik yapısında yapısal immaturite sonucu gelişir.

RDS'nin görülme sıklığı gestasyon haftası ve doğum ağırlığı azaldıkça artar; özellikle 30. gebelik haftasından önce (%70 oranında) oldukça sık görülür(1). RDS'de yetersiz surfaktan nedeniyle akciğerlerde atelektazi ve solunum yetmezliği gelişir. RDS olan bebeklerde kronik akciğer hastalığı (KAH), intraventriküler kanama (İVK), prematüre retinopatisi (ROP) gibi komplikasyonlar görülebilmektedir (2).

Cinsiyet, annenin bazı hastalıkları ve doğum öncesi glukokortikoid tedavisi insidansı etkiler. Respiratuvar distres (solunum sıkıntısı) çeşitli kalp, akciğer, metabolik ve nörolojik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Surfaktan üretim eksikliği ve akciğerlerin gelişmemesine bağlı olarak ortaya çıkan solunum yetersizliğine "respiratuvar distres sendromu" denir (2, 3).

RDS prematüre bebeklerde doğumdan sonraki ilk birkaç saat içinde başlayan, solunum sıkıntısı, takipne, retraksiyonlar, siyanoz ve inleme ile kendini gösterir (3-5).

Prematüre ölen bebeklerin otopsileri sonucunda akciğerlerindeki hiyalen membranlar ilk kez 1903'te tanımlanmıştır. 1950'lerin ortalarında surfaktanın akciğer fonksiyonu için önemi gösterilmiştir. 1959'da Avery prematüre bebeklerin akciğerlerinde surfaktanın eksik olduğunu göstermiştir. 1970'lerde antenatal steroidlerin RDS'nin gelişmesini engellediği bulunmuş ve ventilatör tedavisinin ilkeleri geliştirilmiştir. 1980'de Fujiwara tarafından RDS'li olgularda ekzojen surfaktan uygulamasının tedavideki etkinliği kanıtlanmıştır (3, 6, 7).

Prematüre bebeklerdeki en çok karşılaşılan ölüm ve sekel gelişim nedeni RDS ve buna bağlı olarak gelişen komplikasyonlardır. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin artması, surfaktan tedavisi ve ventilatör uygulamalarındaki gelişmeler ile RDS'ye bağlı ölüm oranı %70'lerden %10-20'lere kadar düşmüştür (4, 6).



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU (RDS)

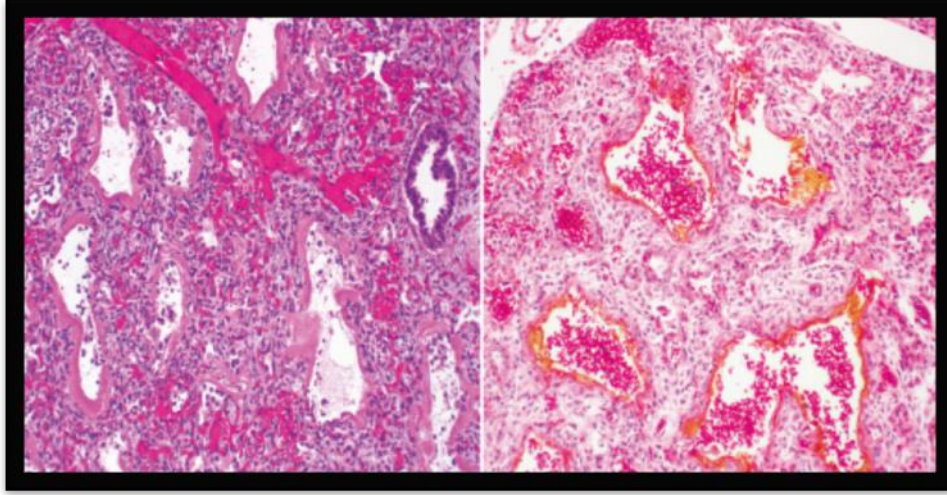
RDS, tedavisinde önemli yenilikler gelişmesine rağmen prematüre bebekler için ciddi morbiditeler ve hatta ölümlerle sonuçlanabilen, temelinde akciğerdeki yapısal immatüriteye eşlik eden alveolar surfaktan eksikliği bulunan klinik tablodur.

RDS, tüm yenidoğanların %1'inde görülmektedir. 28. gebelik haftasının altındaki yenidoğanlarda insidansı %60-80 düzeyinde, 32 ile 36. gebelik haftaları arasında doğan infantlarda insidansı %15-30 iken, 37. gebelik haftasının üzerinde RDS gelişme riski oldukça azalmaktadır. RDS insidansı; diyabetli annelerde, çoğul gebeliklerde, sezaryen (C/S) doğum, asfiksi, soğuk stresi, beyaz ırk ve erkek cinsiyet ile artmaktadır.

2.1.1. FİZYOPATOLOJİ

Respiratuvar distres (solunum sıkıntısı) çeşitli kardiyopulmoner ve sinir sistemi ile ilgili problemlere bağlı olarak gelişebilen semptomdur. Surfaktan eksikliği ile birlikte akciğer yetmezliği sonucu ortaya çıkan respiratuvar distrese “respiratuvar distres sendromu” denir. Diğer adı olan “Hyalen membran hastalığı” ise patolojik tanıdır ve alveolar zedelenme ile birlikte gelişen eksüdasyonlara bağlı oluşan hyalen membranları ifade eder.

Mikroskopik olarak RDS gelişen akciğerlerde, doğumdan hemen sonra ilk saatte alveoler epitelyum hücrelerinde nekroz gelişir ve bazal membrandan ayrılan epitelyum hücrelerinin yerine hyalen membranlar oluşmaya başlar. Tip II hücrelerin içinde granüllerin olmayışı ve vakuollerin bulunması, surfaktan içeren lameller cisimciklerin hepsinin boşaldığına işaret eder. Bu değişiklikler birkaç saat içinde yaygınlaşarak bütün respiratuvar bronşiyollere kadar uzanır. Onuncu saatte alveoler ateletazi ve epitel ayrışması görülür. Dilate hava yollarının çevresini saran hyalen membranlar, hasarlı epitelyum ve kapillerlerden akciğer yüzeyine sızan plazma proteinlerinin koagülasyonu sonucu ortaya çıkar. Membranlar içindeki fibrin hemotoksilen-eozinle boyandığı zaman pembe olarak görüldüğü (Şekil 2.1) ve hyaline benzediği için hastalık bu adı almıştır (2, 4).



Şekil 2. 1. Alveolar kollaps halinde, açık hava yollarında hyalen membranlar (7).

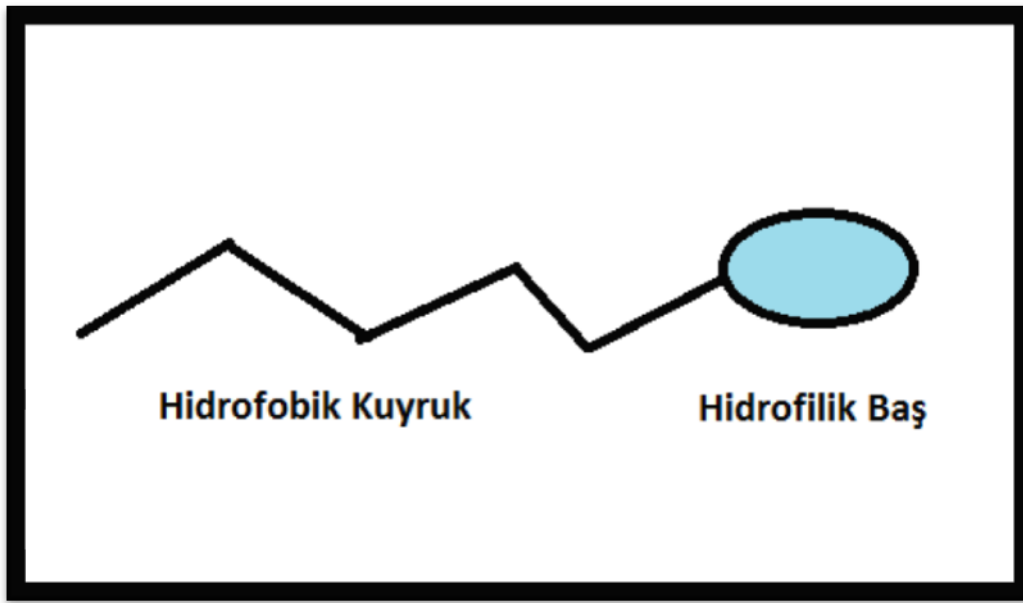
Yaklaşık ikinci günde epitelyum onarımı başlar. Geçiş kanallarındaki küboidal hücreler büyür, mitoz başlar ve hyalen membranların altını doldurmaya çalışır ve alveol içinde surfaktan tespit edilir. Hyalen membranlar bu alandaki makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır, fibrinolizise uğrayarak klinik düzelme ile birlikte 7. günde yok olur (2, 4).

Mekanik ventilasyon yapılan bebeklerde iyileşme süresi gecikmektedir. Hyalen membranlar devam ederken hava yolları sekresyonlar sonucu tıkanır ve fibrozis gelişir. Bu klinik tabloya bronkopulmoner displazi (BPD) denir (2).

BPD, 30-37. gebelik haftasında doğan ve solunum sıkıntısı olan prematürelde gelişen, alveolar ödem, aşırı havalanma alanları ve yoğun fibrozis ile karakterize yaygın küçük havayolları hastalığıdır. Bu bağlamda BPD prematür bebeklerin RDS nedeniyle yüksek basınç ve oksijen ile ventilasyonu sonucu ortaya çıkan oksijen toksisitesi ve barotravma sonucu gelişmektedir (4). Bu klinik tablonun önlenmesi için öncelikle prematüre doğumun engellenmesi, prematüre doğum sonrasında ise RDS tablosu gelişmesinin engellenmesi gerekmektedir.

İnsanda alveol yüzeyinde başlıca iki tip hücre bulunmaktadır; bunlar Tip1 ve Tip 2 pnömositlerdir. Alveol yüzeyinin yaklaşık %96'sını kaplayan Tip 1 hücrelerin başlıca işlevleri gaz alışverişidir (1). Tip 2 hücreler yuvarlak yağ hücreleridir ve surfaktan üretirler. Bunlar 20-24. gestasyonel haftalar arasında histolojik olarak tespit edilebilen ozmofilik lameller içerirler. Surfaktan kelimesi yüzey aktif maddeleri (surface active agent) anlamına gelir ve akciğer fonksiyonu için gereklidir.

Tip II pnömositlerde yapılan surfaktan alveollerde yüzey gerilimini azaltır, ekspiryum sonunda alveollerin kollapsını önler ve bunların stabilitesini sağlar (1, 2). Hava yolundaki epitelin farklılaşması ve sonrasında surfaktan üretimi 24-28. gestasyon haftalarından itibaren başlar; genellikle 35. gestasyon haftasından sonra yeterli düzeye erişir. Surfaktanın yapısı %90 oranında lipidlerdir ve bu lipidlerin en önemlileri fosfatidilkolin ve fosfatidilgliseroldür. Bu lipidler yüzey geriliminin azaltılmasından sorumlu başlıca bileşiklerdir. Fosfatidil gliserol, surfaktanın alveoller içinde yayılmasını ve böylece surfaktanın dağılmasını sağlar. Surfaktan molekülü hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş kısmından (Şekil 2.2) oluşur (2, 8, 9).



Şekil 2. 2. Surfaktanın morfolojik yapısı(8, 10).

Surfaktan proteinleri SP-A, SP-B, SP-C ve SP-D olarak isimlendirilen apoprotein yapısında bileşenlerdir. Surfaktan proteini A, surfaktanın tübüler miyelin formasyonunu sağlar ve surfaktanın etkinliğini azaltan inhibitörlere karşı direnci artırır. Kollajen-karbonhidrat bağlayan uçları lokal pulmoner immünolojik fonksiyonlardan sorumludur. Surfaktan proteini B ise surfaktan sentez sürecinde, surfaktan metabolizması ve işlevlerinde önemli role sahiptir. SP-B'nin eksik olduğu durumlarda, surfaktan yapılamamakta ve alveollerde SP-C üretimi tamamlanamamaktadır. SP-B fosfolipidlerin yüzeye dağılmasını hızlandırırken aynı zamanda geri dönüşümüne yardımcı olur (8-11).

Genetik olarak SP-B eksikliğinde doğumdan sonra ölümle sonuçlanan RDS tablosu gelişir. SP-B'nin amniyon içinde bulunması çok büyük olasılıkla akciğer fonksiyonlarının olgunlaştığını, az bulunması ise çok büyük olasılık ile RDS gelişeceğini gösterir (12).

Surfaktan protein C'nin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte özellikle RDS'de olduğu gibi azalmış akciğer hacimlerinde surfaktan dengesi ve alveollerde dağılımın sağlanmasında rol aldığı, viskoelastisiteyi dengelediği tahmin edilmektedir ve eksikliğinde RDS tablosu gelişmez. Surfaktan protein D'nin alveollerdeki patojen mikroorganizmaları yok ederek, konakçı savunmasında rol oynadığı ve fagositozu arttırdığı düşünülmektedir (13-16).

Çizelge 2. 1. Surfaktan proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları(7,8).

Surfaktan Proteinleri	Çözünürlük	Fonksiyon
Apoprotein A (SP-A)	Hidrofilik	Surfaktanın tekrar sentezinde rol alır ve makrofaj fagositozunu artırır.
Apoprotein B (SP-B)	Hidrofobik	Surfaktanın alveol yüzeyinde yayılmasını sağlar ve yüzeye penetrasyonunu hızlandırır.
Apoprotein C (SP-C)	Hidrofobik	Fosfolipidlerin yüzeye yapışmasını ve yayılmasını sağlar.
Apoprotein D (SP-D)	Hidrofilik	Mikroorganizmalara tutunarak konak defans mekanizmasında rol oynamaktadır.

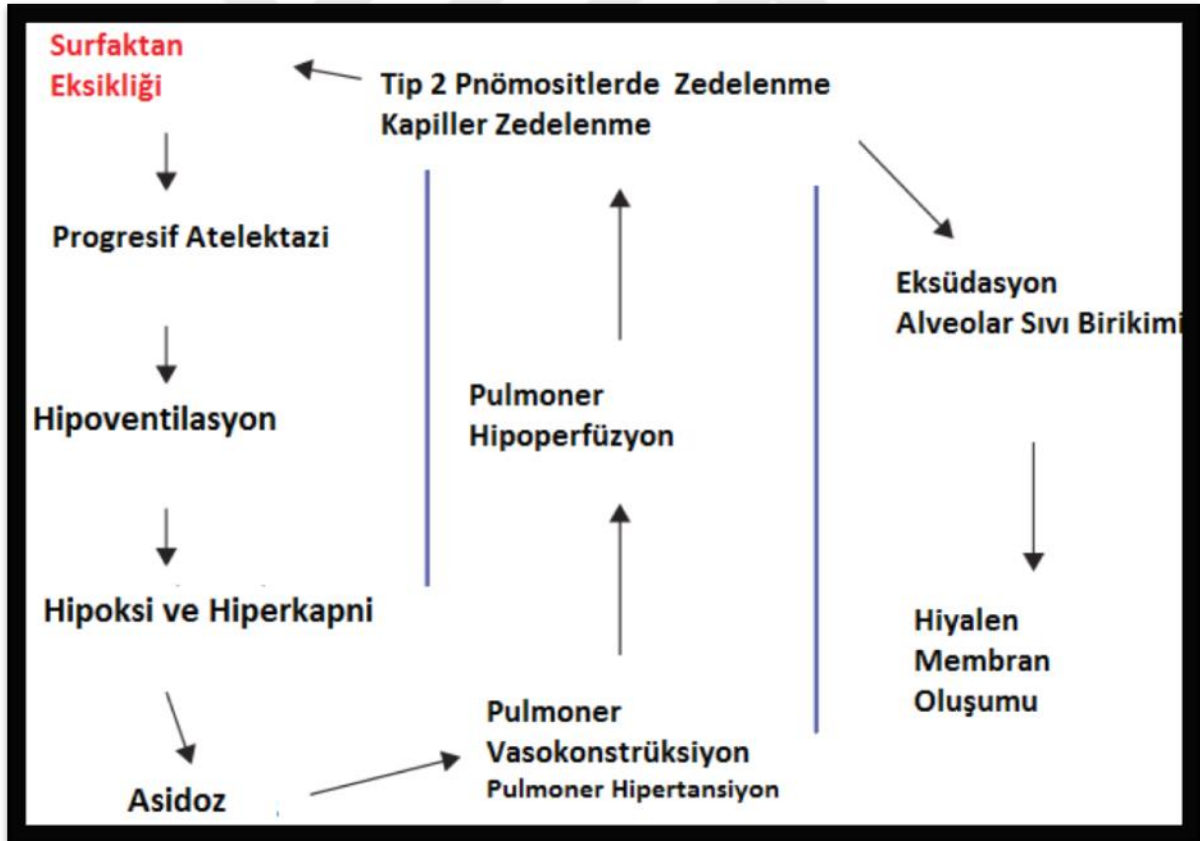
Surfaktan fosfolipidleri tip II pnömositlerin endoplazmik retikulumunda sentezlenir ve bu organelden küçük veziküller içinde gelişen lameller cisimcikler şeklinde salınır. Tübüler miyelin ve fosfolipid kompleksi alveolar yüzeyde tek katlı tabaka oluşturarak, yüzey gerilimini azaltır ve böylece atelektaziyi önler. Surfaktan yokluğunda, akciğerlerdeki alveolar yüzey gerilimi ortalama 70 mN/m iken, ortamda surfaktan bulunması, bu gerilimi ortalama 1 mN/m düzeyine indirir. Hasta tedavi edilmediğinde genellikle solunum yetmezliği gelişir (14, 15).

Alveollerdeki surfaktanın büyük kısmı tip II epitel hücreleri tarafından tekrar alınır ve surfaktan döngüsüne katılır. Ancak surfaktanın bir kısmı alveollerde bulunan makrofajlar tarafından yıkıma uğrar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör ve bu faktör reseptörünün, makrofajların alveollerden surfaktan

temizlemesi sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir. Surfaktan alveolde parçalandıktan sonra fosfolipidler geri alıma uğrar ve tekrar surfaktan yapılır. Bunda SP-A'nın önemli görevi mevcuttur. Dolayısıyla ekzojen fosfolipidler, surfaktan sentezini bu mekanizma (Şekil 2.3) üzerinden artırır (17-20).

Sonuç olarak surfaktanın en önemli işlevleri, alveolar yüzeydeki gerilimi azaltmak ve alveollerin kollabe olmasını engellemektir.

Surfaktan eksikliğine prematüre bebekler, mekonyum aspirasyonu sendromu (MAS) ve hipoksik bebeklerde daha sık rastlanmaktadır. Zamanından önce doğan prematüre bebeklerde bebek ne kadar prematür doğarsa RDS gelişme riski o kadar yüksektir. MAS'da hem mekonyumun kimyasal etkisine bağlı olarak hem de gelişen hipoksik süreç nedeniyle surfaktan sentez miktarı düşer ve surfaktanın yıkımı artar. Yine hipokside de surfaktanın üretiminde azalma ve yıkım miktarında artış izlenmektedir (16, 17).

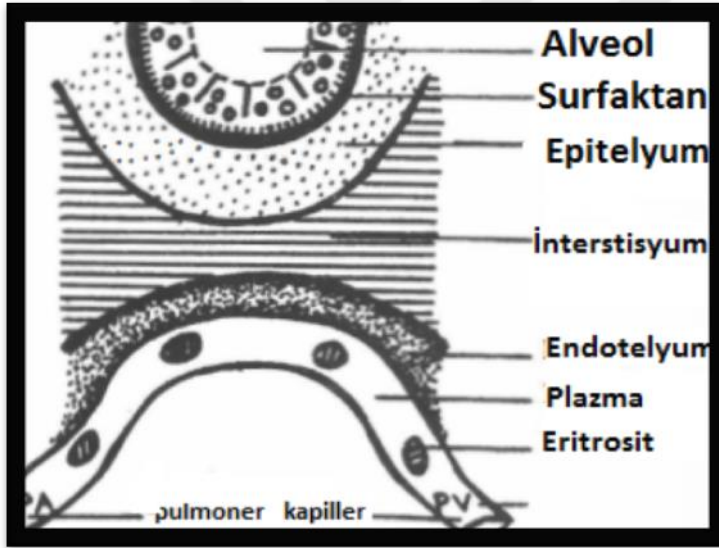


Şekil 2. 3. Respiratuvar distres sendromu patofizyolojisi ve klinik bulguların özeti (17, 21).

Çalışması ve yapısı dikkate alındığında insan akciğerlerinin vasküler yapı ve respiratuvar yolları üç gruba ayrılır. Kan ve hava taşınmasında görevli bölgeler; pulmoner atardamar ve toplardamarların ana kollarını, bağ dokusunu, terminal bronşiyoller ile birlikte bronşlar ve trakeayı içerirken, ara bölge alveoler kanalikülleri ve bronşiyolleri, respiratuvar alan ise alveoller ve onları saran kapiller damarları içermektedir.

Taşıma ve ara bölgeler; respiratuvar ünitelere oksijeni bol olan havayı dağıtma, havadaki partikülleri süzme ve nemlendirmeye birlikte alveoler havadaki artan karbondioksitin solunum ile atılması fonksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Respiratuvar alan ise alveollerdeki hava ile kan arasında gazların değişiminin yapıldığı alanlardır. Alveoller ve onları saran kapiller arasında gaz değişimi (CO_2 , O_2 veya CH_3) gerçekleşmektedir.

Alveol duvarı yaklaşık 8-15 μm çapında küçük damarsal anastomozlar ile bunları çevreleyen hücrelerce oluşmaktadır. Hava ile kan arasındaki alveoler epitelyum, interstisyum ve kapiller damarların endoteli (Şekil 2.4) bulunur (20).



Şekil 2. 4. Alveol-kan bariyeri (20).

Surfaktan eksikliğiyle birlikte ortaya çıkan enflamatuvar yanıt sendromu, patolojik bulguların gelişmesine yol açan en önemli nedenlerden birisidir. Klinik çalışmalar ve deneylerde dokusal hasara neden olabilecek herhangi bir olayda (enfeksiyon, travma, anoksi) makrofajlar ve monosit hücreler tarafından sitokinlerin salgılandığı bildirilmiştir (5, 21). Çeşitli sitokinler (IL-1, TNF) aracılığıyla stromal hücreler uyarılarak, fibroblastlar, endotel, epitel ve mast hücreleri aktive olur ve bu hücreler tarafından ikincil sitokinlerin salınımı gerçekleşir. Bu ikincil sitokinler IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8 üretilmesini uyarır ve

böylece enflamatuvar yanıtta artış gerçekleşir. Bu mediyatörlerin birbiri ile etkileşimi neticesinde enflamatuvar hücreler polimorfonükleer lökositleri (PMNL), mast hücrelerini, makrofaj/monositleri, trombositleri uyarak; koagülasyon- fibrinolizisi ve araşidonik asidi aktive eder (3, 5, 21).

Enflamatuvar yanıt neticesinde akciğerlerin kapiller endotel hücrelerinde gelişen morfolojik değişiklikler, bazı alanlarda hipertrofi gelişmesine ve metabolik aktivitenin değişmesine neden olur. Fagositlerin aktive olması ile oluşan serbest oksijen radikalleri hücrelerin hasarlanmasına ve hücrelerin ölmesine neden olur (16, 17). Bu koşullar altında prematüre bebekte az miktarda bulunan surfaktan inaktive olacağından, surfaktan eksikliği geliştiği gibi verilen ekzojen surfaktan da harcanabilir (22, 23).

RDS'nin gelişmesinde ve/veya klinik tablonun daha kötüye gitmesindeki en önemli faktör prematür doğumdur. Bunun yanı sıra perinatal hipoksi, gebelikte diyabet, sezaryan doğum ve bebeğin erkek cinsiyet olması diğer önemli nedenlerdir (2, 14).

Çizelge 2. 2. RDS gelişme riskini arttıran ve azaltan faktörler (13,14).

RDS Gelişme Riskini Arttıran Faktörler	RDS Gelişme Riskini Azaltan Faktörler
Prematürite	İntrauterin kronik stres
Erkek cinsiyet	Erken membran rüptürü
Sezaryen doğum	Annede hipertansiyon gelişmesi
Perinatal asfiksi	Doğum eyleminin başlaması (Uterin kasılmalar)
Koriyoamniyonit	IUGR veya SGA
Hidrops fetalis	Antenal steroid tedavisi
Maternal diyabet	Tiroid hormonu
Maternal hipotiroidi	Tokolitik ajanlar

RDS gelişimine neden olan birçok klinik durum vardır ve prematürite bunların en önemlisidir (Çizelge 2.2). Preterm doğumda akciğer yapısının gelişmemesi önemli bir problemdir. Prematür bebeklerin akciğer epitellerinin geçirgenliği fazla olması sonucunda

alveol iç yüzeyine sıyan plazma proteinleri surfaktan yapımını azaltır. Yenidoğan bebeklerin alveollerinde bulunan fetal akciğer sıvısı preterm bebeklerde daha yavaş temizlenmektedir. Ayrıca bu bebeklerin asfiksi ve hipotermi gelişimine daha yatkın olmaları RDS'nin sıklık ve şiddetini arttırmaktadır (14, 15). Perinatal hipokside de alveolar epitel hücrelerinde hasar meydana gelir ve böylece surfaktan yapımı azalır. Bunun en iyi göstergesi 5. dakika Apgar skorudur. Apgar skorunun 5. dakika beşin altında olması, bebeklerde RDS sıklığını iki kat arttırmaktadır. Ayrıca hipoksik bebeklerde solunum çabası yetersizdir ve bu bebeklerde klinik tablo daha ağırdır.

Özellikle kan glikozu takipsiz olan diyabetik annelerin fetuslarına çok miktarda glikoz geçtiği ve buna bağılı olarak fetustaki insülin sekresyonunun arttığı gösterilmiştir. Artan insülin glukokortikoidlerin etkinliğini bozar ve tip II pnömositlerin gelişimi gecikir. Bunun sonucu olarak surfaktandaki satüre fosfatidil kolin oranı ve surfaktanın sentezi azalır (14, 15).

Doğum eyleminin fetal alveolar sıvı sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bundan dolayı doğum kontraksiyonları başlamadan sezaryen operasyonu ile doğurtulan bebeklerde RDS daha sık görölmektedir. Erkek fetusta androjen etkisiyle fosfatidil gliserol oluşumunun gecikmesine bağılı lesitin/sfingomiyelin oranının daha geç arttığı gösterilmiştir. Ayrıca kızlarda östrojenin fosfatidil kolin yapımını ve salgılanmasını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı RDS erkek bebeklerde, kız bebelere göre daha çok görölür ve klinik tablo daha ağır seyretmektedir (2, 14, 15).

RDS gelişiminin daha az olduğı durumlar ise SGA (Gebelik haftasına göre küçük) doğum, erken membran rüptürü, doğum öncesi kronik hipoksi, antenatal enfeksiyonlar olarak sıralanabilir (14, 15).

2.1.2. KLİNİK BULGULAR

Prematürite nedeniyle göğüs duvarının yapısal desteğı zayıftır. RDS'li bebeklerde surfaktan eksikliği ve akciğer sıvısının artışına bağılı olarak atelektaziler gelişir ve alveolar ventilasyon olamaz. Akciğerlerin esnekliği (kompliyans) azalmıştır ve alveollerin açılabilmesi için daha yüksek basınç gerekir.

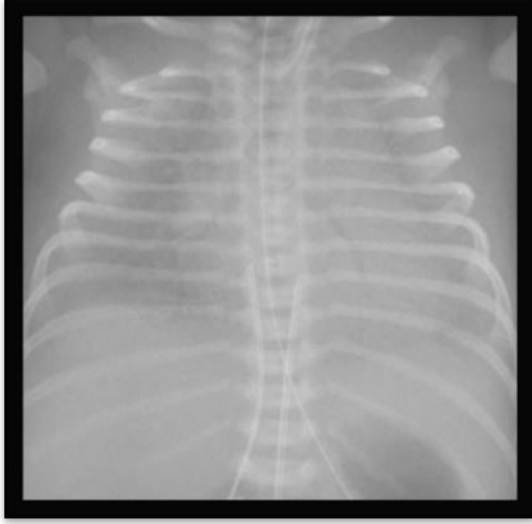
RDS'de kompliyans düşüklüğü ventilasyon-perfüzyon dengesinin bozulmasına yol açar. Hipoksemi, hipoperfüzyon ve anaerobik metabolizmayla birlikte laktik asidozla sonlanır. RDS'deki hipokseminin nedeni ventile olan alveoller etrafında yeterli dolaşımın bulunmaması sonucu ortaya çıkan intrapulmoner sağ-sol şanttır.

Patent duktus arteriyozus veya foramen ovale üzerinden gelişen şant tablonun seyrini ağırlaştırır. Hayatın ilk gününde pulmoner vasküler direncin azalmasıyla birlikte PDA üzerinde soldan sağa şant gelişir ve bunun sonucunda pulmoner ödem oluşur, alveoler düzeyde gaz değişimi azalır (14, 15).

Sonrasında kan gazında hipoksemi ve plazma saturasyon düşüklüğü izlenebilir. PaCO₂ ise çoğunlukla yüksektir. İlerleyen süreçte bebek yorulunca PaCO₂ daha da yükselir ve respiratuvar asidozu takiben perfüzyonun bozulmasıyla metabolik asidoz da gelişebilir (12).

Sonuç olarak surfaktan sentezindeki yetersizlik atelektazilere neden olur. Alveoller ventile olamaz ve hipoksi gelişir. Azalmış akciğer kompliyansı ve yetersiz alveolar ventilasyon hiperkapniye yol açar.

Hiperkapni, hipoksi ve asidoz ile pulmoner arteriyel vazokonstrüksiyona neden olur. Foramen ovale, duktus arteriyozus ve intrapulmoner sağ-sol şantlar gelişir; sonucunda pulmoner kan akımı azalır. İskemik hasar nedeniyle alveolar boşluklara proteinli bir sıvı sızarak surfaktan aktivitesinin daha da azalmasına sebep olur. Bu sürecin uzaması ile birlikte laktik asidoz gelişir. Sonuçta miyokardta fonksiyon kaybı oluşur. Hipoksi ve sonrasında gelişen asidoz, kan basıncında düşme ile birlikte, beyin ve böbrekler başta olmak üzere tüm doku ve organlara zarar verir (4, 14, 15).



Şekil 2. 5. RDS akciğer grafisi bulguları. Alveoller havalanmadığı için normalde siyah görülmesi gereken akciğer alanı beyaz renkli görünmekte (Buzlu cam görüntüsü) (25).

RDS'nin direk grafi bulguları retikülogranüler (buzlu cam) görünümü ile birlikte görülen hava bronkogramlarıdır. Bu bulgular genellikle iki taraflıdır. Retiküler (ağsı) görünüm, çevresinde alveol içi sıvı (direk grafide opak görülür) bulunan açık küçük havayollarını (direk grafide siyah görülür) göstermektedir. Akciğerin havalanma kapasitesinde azalma ve buna eşlik eden yaygın atelektaziler izlenir (Şekil 2.5). Sağlıklı bebeklerde inspiryum sonunda 8-9. torasik vertebralar havalanırken, RDS'li bebeklerin akciğer grafisinde havalanma 5 ve 7. torasik vertebralar düzeyine kadar olmaktadır. Daha ağır vakalarda direk grafide hava bronkogramları görülür. Doğumdan sonra ilk 12 saat içinde çekilen direk grafi normal olmasına rağmen sonrasında direk grafide RDS bulguları görülebilir. Ekzojen surfaktan uygulaması direk grafideki bulguları oldukça kısa bir sürede düzeltebilir (22-24).

2.1.3. RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU TEDAVİSİNDE SURFAKTAN KULLANIMININ BİYOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ

RDS, tedavisinde önemli yenilikler olmasına rağmen prematür bebekler için morbidite ve ölüm riski yüksek bir hastalıktır (25). Patofizyoloji yüzey gerilimini azaltarak alveollerin açık kalmasını sağlayan surfaktan eksikliğinden kaynaklanır. Eksikliğinde yaygın alveolar kollaps gelişir ve bunun sonucunda ventilasyon perfüzyon dengesi bozulur (26, 27).

RDS klinik tablo olarak, doğumdan sonra hızlı nefes alma, inleme, çekilme ve morarmanın görüldüğü solunum sıkıntısı bulguları ile görülür ve ayırıcı tanı olarak yenidoğanın yaş

akciğer hastalığı, zatürre, hava kaçağı sendromları, siyanotik doğumsal kalp hastalıkları düşünülmelidir (25, 26).

RDS'den korunma ve tedavisi; doğum öncesi, doğum salonu ve RDS tanısı sonrası uygulanacak tedaviler olarak belirlenir.

RDS riski taşıyan prematüre bebeklerin doğum işlemi, solunumsal destek tedavisi (non-invaziv ventilasyon, konvansiyonel mekanik ventilasyon) imkanlarının bulunduğu 3. basamak yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin bulunduğu hastanelerde yapılmalıdır (28).

Erken doğum eylemini durdurmak ve doğum öncesi annenin steroid tedavisine zaman kazanmak amacıyla gebeye endikasyonlar dahilinde uterus kasılmasını durduracak tedaviler başlanabilir (29).

Doğum öncesi annenin steroid kullanımı ile yenidoğan bebek ölümü ve RDS gelişme riski azalır. Ayrıca intraventriküler kanama ile nekrotizan enterokolit gelişme ihtimalinde ve invaziv ventilasyon ihtiyacında azalma olur (30).

Prematüre bebeğin doğmasından önce doğum salonunda birtakım önlemlerin alınması gereklidir. Bunun için doğum salonunda birden fazla takım elemanının aktif olması gereklidir. Prematüre bebeklere canlandırma işleminde bulunacak doktorların Neonatal Resusitasyon Programı (NRP) uygulayıcı sertifikası olmalıdır.

ILCOR-2015, resusitasyon uygulanmayan bebeklerde göbek kordonunun 30 saniye süre sonrasında klemplenmesini önermektedir (31). Kordun geç klemplenmesi hematokrit değerinin daha yüksek olmasına, transfüzyon ihtiyacının azalmasına, kan basıncının yükselmesine, intrakraniyal kanama ve nekrotizan enterokolit riskinin azalmasına neden olmaktadır (32).

Preterm bebeklerde hipotermiyle birlikte oksijen tüketiminde artış olur, koagülasyon parametreleri bozulur, kan gazı parametrelerinde asidoz gelişir ve dolayısıyla fetal kan dolaşım sisteminden, neonatal dolaşım sistemine geçiş gecikir. Bu nedenle yapılacak tüm işlemler radyant ısıtıcı altında (26°C) yapılmalıdır. Hastaya zorunlu kalınmadıkça entübasyon uygulanmamalı, non-invaziv ventilasyon teknikleri tercih edilmelidir.

Surfaktan tedavisi uygulamak RDS'li prematüre bebeklerde mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır. RDS'li bebeklerde etkinliği kanıtlanmış doğal surfaktanlar ilk tercih olarak kullanılmalıdır. Hayvanlardan elde edilen surfaktanların, sentetik surfaktanlara göre ölüm riskini azaltmada daha etkin olduğu gösterilmiştir (33). Surfaktan ürünleri arasında her hastanedeki yenidoğan üniteleri farklı deneyimler sunmakla birlikte RDS tedavi etkinliği, bronkopulmoner displazi gelişimi ve uzun dönem sinir sistemi gelişimini etkilemesi açısından fark yoktur. Surfaktan verilirken ve tedavi etkinliği takip edilirken hasta monitörize edilmelidir. Endotrakeal tüpte tıkaç, apne, desaturasyon, bradikardi, hiperventilasyon riski ve pulmoner hemoraji açısından hasta yakın takip edilmelidir. Hastanın tedaviye yanıtı; oksijen ihtiyacının azalması, solunum destek tedavisinde basınç gereksinimlerinin azalması, kan gazı değerleri ve radyolojik (akciğer direkt grafisi) düzelmesi ile değerlendirilir.

RDS bulguları gelişip, surfaktan ihtiyacı gelişen prematürelerde tedavinin en hızlı şekilde uygulanması önerilen en güncel stratejidir (34). Surfaktan uygulanması için öneri FiO₂ ihtiyacının $\geq 40\%$ olmasıdır. Prematüre bebeklerin monitörizasyonu sırasında hedef saturasyonunun 90% ve 94% aralığında olması önerilir (35). Saturasyonu bu hedef saturasyon aralığında tutmak bebeklerin hipoksi ve hiperoksinin zararlı etkilerinden korur.

Fizik muayene bulguları gerilemeyen ve oksijen ihtiyacı 40% 'tan fazla olan bebekler tekrarlayan dozda surfaktan ihtiyacı duyar. Mevcut surfaktanların tekrar etme süreleri ve her birinde önerilen en yüksek tekrarlayan doz sayısı farklıdır. Bu ürünlerden Poraktant Alfa'nın ilk uygulamadaki dozu 200 mg/kg olarak uygulanırsa tekrarlayan surfaktan uygulama ihtiyacının azaldığı bildirilmiştir (36).

Surfaktan tedavisi yenidoğan entübasyon tecrübesi olan ve ventilatör konusunda deneyimli bir yenidoğan hekimi tarafından uygulanmalıdır. Birçok prematüre bebeğe surfaktan tedavisi verilmesi sonrasında non-invaziv ventilasyon (Nazal ventilasyon, endotrakeal tüp uygulaması yapmadan) desteği verilebileceğinden surfaktan vermek için INSURE (entübe edip, surfaktan ver, sonra ekstübe et) tekniği kullanılabilir (37). Ayrıca laringeal maske ve nebulize surfaktan uygulamaları ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler surfaktan uygulama kılavuzlarına dahil edilecek aşamaya henüz ulaşamamıştır (38).

Bu hastalara surfaktan tedavisi sonrasında klinik durum el verdiği sürece non-invaziv ventilasyon yöntemi uygulanmalıdır. Non-invaziv ventilasyon desteği olarak CPAP (continuous positive airway pressure), NIPPV (nasal intermittent positive pressure ventilation), HHHFNC (heated humidified high flow nasal cannulae) ve nazal HFOV (nasal high frequency oscillatory ventilation) kullanılabilir. RDS tedavisinde en uygun tedavi şekli CPAP (Başlangıç basınç düzeyi en düşük 5 cmH₂O olmalıdır) ve erken surfaktan tedavisidir. CPAP'den hastayı ayırırken basınç düşölmesiyle birlikte kademeli olarak solunum desteğinin geri çekilmesi daha etkin olabilir. NIPPV, nazal ara aparatlarla, invaziv ventilasyonda uygulanan tepe basınçlarının (PIP), mekanik ventilatörler aracılığıyla uygulanması yöntemidir (39). Yayınlanmış çalışmalarda ekstübasyon sonrası ve geç preterm bebeklerde uygulandığı için HHHFNC'nin prematüre bebeklere uygulanması konusunda daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır (40). Nazal HFOV'nin vaka serilerinde başarılı olduğu gösterilse de, klinik etkinliği konusunda kesin veriler yoktur ve bu konuda daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır (41).

Prematüre bebekleri nazal ventilasyon teknikleriyle tedavi etme eğilimine rağmen, prematüre bebeklerin yatış sürecinde, yarıya yakınında entübasyon ve invaziv mekanik ventilasyon ihtiyacı doğmaktadır. Ventilatör tedavisinin etkin olması için PEEP (pozitif end ekspiratuvar basınç) uygulamasıyla solunum döngüsünün tamamında alveollerin açık kalması gereklidir. Konvansiyonel ventilasyon süresince optimal PEEP değeri ayarlamak için FiO₂ düzeylerine dikkat edilmelidir.

Volüm garantili senkronize ventilasyon tekniklerinde solunum desteği süresi daha kısa olmakta ve hava kaçağı, hipokarbi, ölüm ve BPD gibi komplikasyonlar daha ender görölmektedir. Bu nedenle RDS tedavisinde tercih edilmesi faydalıdır ve tidal volümü 3-7 ml/kg olarak ayarlanmak gerekmektedir (42).

Mekanik ventilasyon tedavisi süresince hem hipokarbi hem de hiperkarbi gelişmesinden kaçınılmalıdır. Bu gibi durumlarda bronkopulmoner displazi, periventriküler lökomalazi (PVL) ve intrakraniyal kanama riski artmaktadır. Spontan solunum çabası varlığında yeterli gaz değışimi ve kan gazı değerlerinde düzelme sağlanır sağlanmaz ventilatörden ayırma süreci başlatılmalıdır.

Kafein tedavisinin prematüre apnesini engellemesinin yanı sıra ekstübasyon başarısızlığını önlediği, bronkopulmoner displaziye önlediği, 1,5 yaşta nörolojik sekel olmadan yaşama olasılığını arttırdığı gösterilmiştir (43, 44). Bu nedenlerle mekanik ventilatörlere ihtiyacı azaltmak amacı ile rutin olarak verilebilir.

RDS'de enfeksiyon gelişimi ekarte edilene kadar koruyucu antibiyotiklere (penisilin ya da ampisilinin aminoglikozid kombinasyonu) başlanabilir. Prematüre bebeklerde vücut ısısını 36,5-37,5 °C arasında korumak gereklidir. Bunun için servo-kontrollü küvözler kullanılabilir ve küvöz içi nem %60-90'lara çıkılabilir (45).

Büyüme geriliğini engellemek için postnatal ilk günden IV parenteral nutrisyon (intravenöz beslenme solüsyonu) başlanmalıdır. Yine bütün prematüre bebeklere doğumdan itibaren minimal enteral beslenme başlanmalıdır, çünkü prematür bebekler için en iyi besin bebeğin kendi annesinin sütüdür (46).

Hipotansiyon gelişen prematüre bebeğin tedavisinde halen mevcut kabul gören uluslararası bir protokol yoktur. Ancak genel olarak sistemik tansiyonun düşük olduğu durumlarda dopamin, kardiyak outputun az olduğu vakalarda dobutamin inotrop ilk olarak tercih edilmektedir (47). Yine solunum desteği alan prematürelerin hemoglobin düzeyleri doğumdan sonra bir hafta süresince 12 g/dl, ikinci hafta süresince 11 g/dl, üçüncü hafta süresince 10 g/dl ve daha sonrasında 9 g/dl düzeyinin üzerinde bulunmalıdır (48). Ventilasyon sırasında rutin olarak sedasyona gerek yoktur. RDS tedavisi sırasında prematür bebeklerde olabildiğince az ağrılı girişim uygulanmalıdır (49).

2.1.4. AKUT FAZ REAKTANLARININ ENFLAMASYON GELİŞİMİNDEKİ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE ENFLAMATUVAR HÜCRELER ARASI ETKİLEŞİMLERİ

Dokusal hasar ve enflamasyonda, insan vücudu bu hasarı düzenlemek amacıyla akut faz reaktanları gibi mekanizmaları devreye sokmaktadır. Bazı plazma proteinlerinin düzeyi akut enflamasyonda veya farklı tipte doku zedelenmelerinde artar veya azalır. Enflamasyonda artanlar isimlendirilirken pozitif akut faz reaktanları, azalanlar isimlendirilirken negatif akut faz reaktanları olarak adlandırılır.

Çizelge2. 3. Pozitif akut faz reaktanları ve negatif akut faz reaktanları (50-53).

Pozitif Akut Faz Reaktanları	Negatif Akut Faz Reaktanları
CRP	Transferrin
Alfa-1 antitripsin	Albumin
Haptoglobulin	Prealbumin
Alfa-1 antikomotripsin	Retinol bağlayıcı protein
Fibrinojen	
Seruloplazmin	
IgG, IgM, IgA	
Beta-2 mikroglobulin	

C-reaktif protein (CRP), enfeksiyon ve doku zedelenmesi sonucunda hızla yükselme gösteren bir akut faz reaktanı olup, doğal bağışıklık yanıtı proteinlerinden olan pentraksin ailesinin bir üyesidir (50). İlk olarak 1930 yılında pnömonili hastalarda tanımlanan protein *Streptococcus pneumoniae*'ya ait C-polisakkariti ile çökmesi nedeniyle “fraksiyon-C” olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde ise CRP olarak isimlendirilen protein, birbirine simetrik, non-kovalan şekilde bağlanan ve her biri 23 kDa büyüklüğe sahip pentamer yapılı bir proteindir (51, 52). CRP, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), IL-6 ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ile daha çok karaciğerde sentezlenmektedir (53). Oksidatif stres inflamatuvar yanıt oluşturur ve makrofajlar tarafından inflamasyonu arttıran sitokinler salınır. Bu sitokinlerden biri olan IL-6, karaciğerde bulunan reseptörlerine bağlanarak CRP sentezini artırır. Bakteriyel, viral, fungal enfeksiyonlarda, doku nekrozu, kanser ve ARDS gibi inflamatuvar tablolarda CRP düzeylerinde artış gerçekleşmektedir. CRP ayrıca vasküler dilatatör olan prostosiklinler üzerine negatif etkilidir (54). CRP düzeyleri inflamasyon başlangıcından itibaren 4 ile 6 saat sonra serumda artmaya başlar ve 24 ile 48 saat sonra pik yapar. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık olarak 19 saattir ve tüm koşullar altında benzerdir. Bu nedenle CRP plazma konsantrasyonunu belirleyen tek ölçüt yine CRP'nin sentez hızıdır (55).

Sitokinler hücreler arasında sinyal iletiminde görevli, molekül ağırlıkları 20-30 kDa arasında değişen, yapısı peptid veya glikoprotein olan biyolojik mediyatörlerdir. Lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve tümör hücreleri gibi birçok

hücre grubu tarafından sentezlenerek, inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerini arttıırırlar (56).

Multifonksiyonel bir sitokin olan IL-6, 22.000-30.000 kDa arasında molekül ağırlığına sahiptir ve 184 aminoasit dizininden oluşur. Bu sitokinin kodlayan gen 7. kromozom üzerinde bulunur. En önemli kaynağı mononükleer fagositoz yapan hücrelerdir (57).

IL-6, immun yanıt ve hematopoez regülasyonu ile konağın immün cevabında önemli bir role sahiptir. Sitokinler, bakteriyel endotoksinler, virüsler, fibroblastlar, antiijenler IL-6 oluşumunu uyarır. Aktive olmuş B hücre dizisinin immünglobülin salgılayabilmesinde, T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalmasında rol alır (56).

IL-6 hepatik CRP sentezinin en önemli uyarandır. IL-6; CRP, serum amiloid A, fibrinojen, alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin üretimini uyarırken, albümin, transferrin, prealbümin gibi proteinlerin üretimini azaltır (58).

IL-6 inflamatuvar cevabın önemli bir mediyatörüdür, enfeksiyona karşı çoğalan hücreler ve hasar gören dokular tarafından salgılanır. IL-6 üretimindeki artış, bronşiyal hiperaktiviteye yol açarak bronşiyal inflamasyon gelişimine neden olur. Yine enfeksiyon sırasında IL-1 ve TNF, direkt IL-6 geni üzerinden IL-6 üretimini arttırır. IL-6'nın antiviral etkinliği interferonları uyararak oluşmaktadır (56, 57).

Fibrinojen, koagulasyonda etkinliği olan akut faz reaktanı olup, molekül ağırlığı 340 kDa'dur ve iki alt ünitiden oluşmaktadır. Molekülün iki yarısı, amino terminal bölgeden paralel zıt yönlü zincirler arasındaki disulfid köprülerle birbirine bağlanır. Amino terminal uçlarındaki fibrinopeptid A ve fibrinopeptid B olarak adlandırılan bölümleri, yapısında aspartat ve glutamat kalıntılarının bulunması nedeniyle negatif yüklüdür ve bu durum plazma çözünürlüğünü arttırmaktadır (59). Hemostazda, dokunun onarılması ve yaranın iyileşmesinde önemli işlevleri olan fibrinojenin yenidoğan döneminde plazma düzeyi 30-150 mg/dl arasındadır. Akut faz cevabı esnasında oluşan fibrinojen seviyelerindeki artış 24 saatte belirginleşir ve plazmada en yüksek seviyeye ulaşması 3 ila 5 gün sürer. İnflamasyonun azalmasıyla yavaş bir şekilde normal plazma düzeyine düşer (60).

Lökosit sayısı ve absolüt nötrofil sayısı, immatür lökosit/total lökosit oranı (I/T) gibi lökosit indeksleri bugüne kadar birçok araştırmaya konu olmuştur. Normal nötrofil

sayısının alt sınırı doğumda $1800/\text{mm}^3$ iken doğum sonrası 12.saatte $7800/\text{mm}^3$ 'e çıkar ve doğum sonrası 72. saatte yeniden $1800/\text{mm}^3$ düzeyine iner. Benzer şekilde immatür nötrofil sayısında da yükseliş görülmektedir (61).

I/T oranının normalde üst sınırı doğumun hemen sonrasında 0,20 iken, doğum sonrası 5. günde 0,12'ye düşer ve yenidoğan döneminde sabit kalır. Yine aynı çalışma bulgularında total nötrofil ile birlikte immatür nötrofil sayısı ve I/T oranının normal olması halinde negatif prediktivite değerinin %100 olduğu belirtilmektedir (61).

Krediet ve arkadaşları (1992) inflamasyonun erken safhalarında, I/T oranının sensitivitesini %86 olarak tespit ederken, spesifitesini ise %68 olarak bulmuşlardır. Geç sepsiste ise erken sepsisin aksine I/T oranının sensitivitesini %68 olarak belirlerken, spesifitesini %85 bulmuşlardır (62). Prediktif değerlerde göz önüne alındığında görülen bu geniş aralıkların birden fazla nedeni vardır. Çalışmalara alınan vaka grupları farklı olabileceği gibi enfeksiyon dışındaki nedenler bu hematolojik farklılıklara yol açabilir. Asfiksi, RDS, annede yüksek ateş ve zorlu doğum gibi spesifik olmayan stres nedenleri I/T oranında artışa yol açarken, gebelikte gelişen tansiyon yüksekliği I/T oranında değişikliğe yol açmamaktadır (61).

İnflamasyon gelişen bölgeye kan akımında artış ve kapiller damar duvarındaki geçirgenlikte artış gelişir. Bu durum, inflamasyon gelişiminin erken safhalarında ilk olarak nötrofillerin, sonrasında monosit ve lenfositlerin inflamasyon alanına göç etmesi ile sonuçlanır. Bu aşama sonrasında IL-1, TNF, interferon ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımı başlar. İnflamasyon sürecinde lökositlerden dokuya proteolitik enzimlerin salınımı gerçekleşir (63). Bu proteolitik enzimler ise enzim inhibitörleri tarafından etkisizleştirilir.

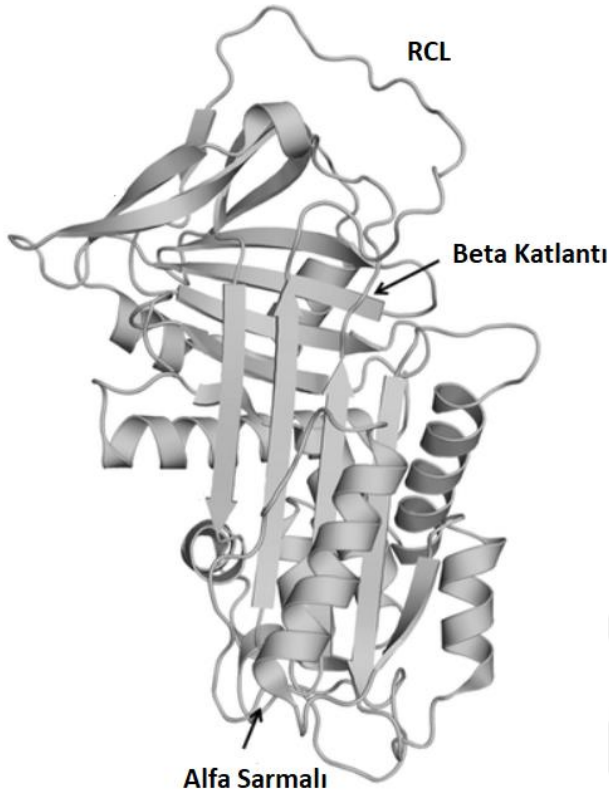
Akut faz proteinlerinden ilk CRP ve alfa-1 antikomotripsin yükselir. Alfa-1 asit glikoprotein inflamasyon başlangıcından 12 saat sonra yükselir, onu sırası ile alfa-1 antitripsin, haptoglobin ve fibrinojen yükselişi izler, en son kompleman C3 ve seruloplazmin düzeyi yükselir (64).

Serpin (serin proteinaz inhibitörü) süper ailesi, ilk olarak proteaz inhibitörleri olarak bilinen bir protein grubunu içermektedir. Bununla birlikte, daha sonra bazı üyelerinin depolama ve transport proteinlerine katıldığı bulunmuştur. Sindirim, pıhtılaşma, fibrinoliz,

kompleman regülasyonu, inflamasyon, apoptoz, anjiyogenez, tümör supresyonu ve hormon taşınmasında önemli rolleri vardır. Serpinopatiler, bazı serpin üyelerindeki nokta mutasyonlarından kaynaklanır. Hücreler içinde tutulan polimerlerin birikimi ile karakterize “toksik fonksiyon kazancı” ya da proteolitik kaskadları kontrol eden inhibitörlerin eksikliğinin sonucu “fonksiyon kaybı” ile hastalığa neden olurlar.

Alfa-1 antitripsin (AAT), glikoprotein yapısındadır ve karaciğerde sentezlenir. Aynı zamanda monositler, makrofajlar, pulmoner alveolar hücreler ve bağırsak epitel tarafından daha az miktarda üretilir (65). AAT, serin proteaz inhibitörü SERPIN (Serin Proteinaz İnhibitor, Grup A) süper ailesinin prototipik üyesidir. İnsan AAT, 52 kDa'lık bir serum glikoproteinidir (66). AAT aktive olmuş nötrofillerden salınan proteinaz 3, elastin ve katepsin G gibi proteazların etkinliğini önler. AAT'nin plazma konsantrasyonu (1,5-3,5 gr/l) yüksektir ve doku enflamasyonuna neden olan enzimlerin dokuya verdiği zararı engeller. En önemli görevi akciğerde nötrofil kaynaklı elastazın neden olduğu ekstrasellüler matriks bozulmasını engellemektir. Bu proteazlar, fagosit edilmiş mikroorganizmaları sindirmek için fagolizozomlar içinde hücre içi olarak hareket eder. AAT, tripsin, kimotripsin ve plazminojen aktivatörünü geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (67). AAT, yaklaşık 5 günlük yarılanma ömrü ile dolaşımda en bol bulunan proteaz inhibitörüdür (68). AAT geni, 14q32.19 kromozom üzerinde yer almaktadır. AAT kodlayan gen, SERPINA1, 12,2 kb uzunluğundadır; yedi ekzon (Ia, Ib, Ic ve II–V) ve altı introndan oluşur. Alfa-1 antikimotripsin, AAT psödogeni, kortizol bağlayıcı globulin ve protein C inhibitörü içeren bir gen kümesinde bulunur (69).

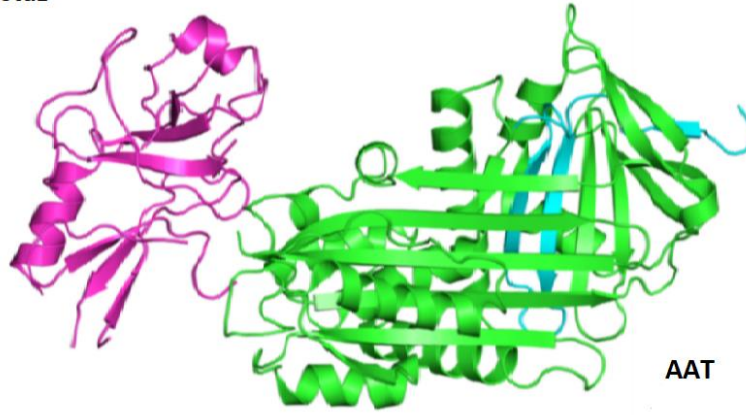
Herhangi bir proteinin işlev görmesi için doğru üç boyutlu şekline katlanması gerekir. Proteinlerdeki aminoasit dizilimi doğru katlanımı kontrol etmektedir. AAT, 394 aminoasitin bulunduğu üç beta tabaka ve 9 alfa sarmalından oluşan bir proteindir. Alfa heliks, her 4 aminoasitte bir kurulan kovalent olmayan hidrojen bağları ile şeklini koruyan kıvrımlı bir yapıdır ve kıvrımlı yapısından dolayı dayanıklı bir formdur. Beta tabaka yapısındaki polipeptit zincirleri paralel veya anti-paralel olabilir. Omurganın paralel bölgeleri arasında hidrojen bağları oluşmuştur. İkincil yapı katlanmalarında ayrıca kovalent olmayan iyonik bağlar da rol alır (68, 70). Yapının önemli bir parçası, AAT'nin inhibitör özgüllüğüne aracılık eden, molekülün ana gövdesinden çıkıntı yapan reaktif merkez halkadır (RCL) (Şekil 2.6) (71).



Şekil 2. 6. Alfa-1 antitripsinin şematik yapısı(72).

AAT, RCL içindeki spesifik kalıntılar aracılığıyla hedef proteinazına bağlanır ve ardından proteinaz, RCL'yi parçalamaya çalışır. Daha sonra proteinaz ve AAT arasında bir kovalent bağ oluşur. RCL, proteinazı alfa-1 antitripsinin karşı ucuna doğru sürükleyerek, beta katlantılarının arasına yerleşir ve böylece aralarında oluşan bağın yapısı bozulmadan kalır. Bu konformasyonel değişikliğin sonucunda, proteinazın katalitik olarak inaktif hale gelmesi ve alfa-1 antitripsinin ise çok daha stabil hale gelmesi sağlanır (Şekil 2.7)(71-73).

Elastaz



Şekil 2. 7. Elaestaz-AAT kompleksinin şematik yapısı (75).

Glikozilasyon enzimler aracılığıyla sakkaritlerin birbirine bağlanarak proteinlere, lipitlere veya organik moleküllere bağlı glikanlar oluşturma sürecidir. Altı sınıf glikan üretilir ve asparajin kalıntılarının amid azotuna bağlananlar N-bağlı glikanlar olarak adlandırılır. Glikozilasyon proteinlerin doğru katlanmasına ve kararlı olmasına destek olur. Ayrıca proteinlerin dağılım ve aktivitesi üzerine etkilidir. N-bağlı glikozilasyon ökaryotik proteinlerin katlanmasında önemlidir. N-bağlı oligosakkaritlerde, hedef proteindeki asparajine (Asn) önce 14 şekerli bir prekürsör eklenir. Bu öncülün yapısı çoğu ökaryotta aynıdır, 3 glukoz, 9 mannoz ve 2 N-asetilglukozamin molekülü içerir. Karmaşık bir tepkimeler dizisi ile bu dallı zincir dolikol adı verilen bir taşıyıcı moleküle eklenir ve sonra hedef protein endoplazmik retikulum lümenine geçerken polipeptit üzerindeki uygun yere aktarılır (74). İnsan AAT'si, yaklaşık %15 karbonhidrat içeriğine sahip bir glikoproteindir (75). AAT, polipeptit omurgasında üç spesifik bölgede asparajin (Asn) bağlantılı glikozilasyon gösterir. Bu pozisyonlardan ikisi, ekson II içinde kodlanmış Asn 46 ve Asn 83'te bulunur ve diğer pozisyon, ekson III içinde kodlanmış Asn 247'de bulunur. AAT, Asn-46, Asn-83 ve Asn-247 pozisyonlarından N-glikozillenir (76).

Alfa-1 antitripsin; proteazlar, sitokinler, yağ asitleri, lipoproteinler, prohepsidin, surfaktan protein A ve kompleman sistemi ile bağlanabilir. Böylece antiproteaz, apoptoz inhibisyonu, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, doku onarımı ve antioksidan aktivite gösterir (77). Glikozilasyon, proteoliz ve bozunmaya karşı koruyarak protein stabilitesini artırır. Ayrıca, glikanlar, salgılanan AAT proteininin yarı ömrünü uzatır ve agregasyonunu önler (78, 79).

AAT'nin 100 kadar varyant alleli bulunmaktadır. Her bir fenotip; aminoasit değişikliklerine, izoelektrik fokuslamadaki geçiş hızlarına göre temel olarak M, S, Z, F olarak isimlendirilir. Dünya genelinde en çok görülen allel PİMM (Normal Allel) alleli olup, normal AAT fonksiyonu olan alleldir. AAT, karaciğer dışında akciğer, bağırsak epitel hücrelerinde, nötrofil ve alveolar makrofajlarda üretilmektedir (80).

AAT, SERPIN st ailesinin ayırt edici özelliği olan, üç tabaka ve dokuz sarmal üniteden oluşan bir yapıya sahiptir. Merkezi tabakanın yapısal kararsızlığı inhibitör işlev ve polimer oluşumu için gereklidir. AAT'nin çeşitli genetik varyantları, rneğin Z (Glu342Lys) varyantı, sıralı doğrusal polimerlerin oluşumu için bir eğilime sahiptir. Eksik varyantlardan en sık görülen PİZZ allelidir. Z mutasyonu klasik SERPIN polimerizasyonundaki, RCL ile beta-tabakalar arasında olan ilişkiyi bozar (81). C-terminal bölgesinde gelişen disülfid alanının değişimi muhtemelen Z-AAT'nin patolojik polimerlerinin temelidir. şiddetli alfa-1 antitripsin eksikliği bulunan hastaların %95'inden fazlasında mevcuttur (82). Homozigot hastalarda, protein sadece endoplazmik retikulumdan verimsiz bir şekilde salınmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğerde birikir. Karaciğer hasarının şiddeti geçici neonatal kolestazdan siroza kadar uzanır (83).

Z-AAT protein agregatları olarak AAT geni genotipik olarak; normal allel (PİMM), taşıyıcı allel (PİMS, PİMZ) ve eksik allel (PİSS, PİSZ, PİZZ) olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir (66). Her bir fenotip; aminoasit değişikliklerine, izoelektrik fokuslamadaki geçiş hızlarına göre temel olarak M, S, Z, F olarak isimlendirilir (67).

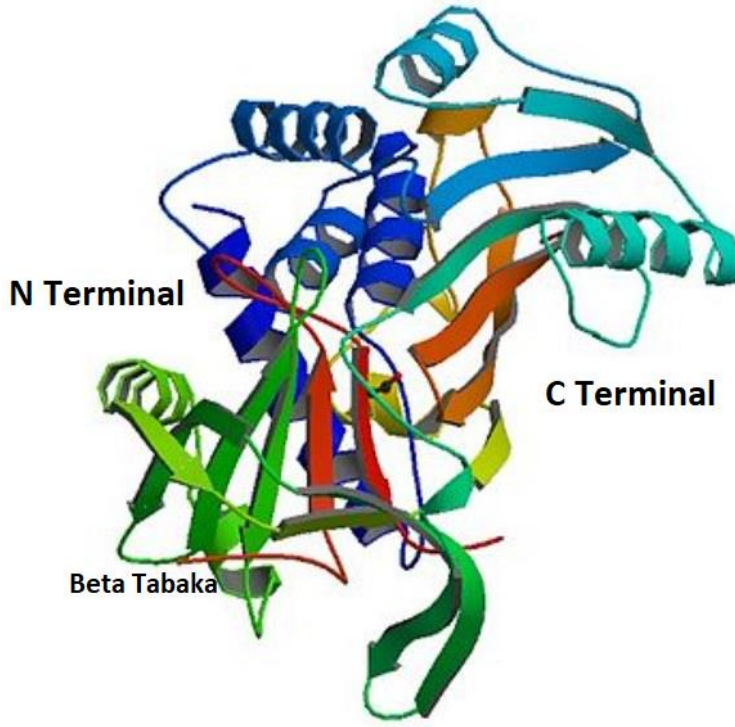
Dünya genelinde en sık saptanan allel PİMM alleli olup, normal AAT fonksiyonunu yerine getirmektedir (84). Alfa-1 antitripsin eksikliği sıklığı 1/1600-1/1800 arasında değişen otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır (85-87). Alfa-1 antitripsin eksikliğinde akciğerde amfizem, kronik karaciğer hastalığı ve nadiren astım, bronşektazi, glomerülonefrit, pankreas tutulumu grlmektedir (88). Yetersiz antiproteaz aktivitesi olan hastalarda mikroorganizmalar ve inflamatuvar uyaranlar ile nötrofil elastaz etkisi akciğer dokusunun yıkımına neden olur (89). AAT'nin plazmadaki yarılanma ömrü 12-24 saat olarak değişmektedir. Birçok vücut sıvısında bulunan enzimin alt solunum yollarından alınan örneklerdeki miktarının serumdaki ile eşit olduğu gösterilmiştir (90). Alfa-1 antitripsin haricinde; matriks metalloproteinler, TNF-, anti-oksidan enzimler üzerinde

etkinliği olan genler, transforming growth faktör-beta1 (TGF- β 1) ve interlökin etkinliğini düzenleyici genler ile histon deasetilaz (HDAC) aktivitesini engelleyen gen bozukluklarıyla birlikte 2. kromozom, 12. kromozom ve 22. kromozomla ilgili problemlerde kronik akciğer hastalığı görülebilmektedir (91-93). Bunlardan alfa-1 antitripsin eksikliği haricinde kalan genetik problemlerde hastalık gelişmesi için epigenetik etkileşimlerin bulunması gerekmektedir.

Serpin ailesinin bir üyesi olan alfa-1 antikimotripsin, nötrofil proteinazı, katepsin G'yi ve mast hücre kimazlarını inhibe eder ve alt solunum yolunu proteolitik enzimlerin vereceği hasardan korur (94). Alfa-1 antikimotripsin, plazma konsantrasyonu doku hasarından sonra hızla artabilen, DNA bağlayıcı bir glikoproteindir. Özellikle IL-6, AAKT üretimini indükler. İnsan AAKT birçok proteolitik kaskadın kontrolünde anahtar rol oynayan, serin proteinaz inhibitörü olan serpin süper ailesinin bir üyesidir. Esas olarak karaciğer ve bronş epitel hücreleri tarafından üretilir (95).

AAKT, plazmada bulunan bir glikoproteindir ve bu proteinin yaklaşık %25'i karbonhidrattır. AAKT molekül ağırlığı 45 ile 68 kDa arasında değişmektedir, glikozile yapısı bulunan proteinin moleküler ağırlığındaki varyasyon, glikozilasyon mikroheterojenitesine atfedilir (96). Protein tanımlanmış beş N-glikozilasyon bölgesi içerir, bunlar 93, 106, 127, 186 ve 271. pozisyonlardaki asparajin rezidülerini doldurur (97). Diğer inhibitör serpinler gibi, aktif α 1-antikimotripsinin kristal yapısı, dominant A β -tabakasına ek olarak B ve C β -tabakaları, sekiz iyi tanımlanmış α -heliks ve iki asparajin rezidü içeren bir mobil reaktif merkez halkadan oluşur. AAKT, birbirine paralel altı beta tabakanın bulunduğu iki ana yapıdan oluşur, bu iki ana bölümü (A ve B bölgeleri) birleştiren aktif bölge bulunmaktadır. A bölgesi Asp 102 ve His 57 katalitik kalıntılarını içeren, B bölgesi katalitik üçlünün diğerisi olan Ser 195 kalıntısını içerir. B bölgesi ayrıca substrat bağlanma bölgesini (Şekil 2.8) içerir (98). Proteazı bağlayan alfa-1 antikimotripsinde reaktif merkez halkanın N-terminal kısmı tamamen A β -tabakasının ortasına doğru yer değiştirir (99).

Alfa-1 antikimotripsin, serpin ailesinin diğer üyelerine benzer olarak döngü şeklinde polimerler oluşturur (100).



Şekil 2. 8. Alfa-1 antikimotripsinin şematik yapısı (100, 102).

Matür yapıdaki protein 394 amino asit içerir. Aminoasit dizilimi AAT ile %45 benzerlik göstermektedir. AAKT geni, 14q32.1 kromozom üzerinde yer almaktadır, beş ekzon ve dört intron içerir (99). On dördüncü kromozomun uzun kolunun distal ucunda AAT ile aynı lokusu paylaşır ve SERPINA3 geni tarafından kodlanır. Nükleotid dizisinden elde edilen antikimotripsinin tam amino asit dizisinde 4 pozisyonda (8, 68, 161, 246) glikolizasyon bölgeleri bulunmaktadır (101). N-glikanaz ve merkaptotanol ile deglikolize edilen antikimotripsinin 56 kDA, 52, kDA ve 48 kDA'luk üç farklı bant olarak tespit edildiği gösterilmiştir (102).

Glikozilasyon, ökaryotik hücrelerde görülen ve endoplazmik retikulumda başlayan postranslasyonel protein modifikasyonudur. Proteinin üzerinde spesifik asparajin rezidülerine oligosakkarit prekürsörlerinin transferi ile gerçekleşir. Endoplazmik retikulumda öncü oligosakkaritler ve ilk olgunlaşma aşamaları tüm ökaryotlarda ortaktır. Golgi organelindeki N-glikan olgunlaşmasının sonraki aşamaları türe özgüdür ve türler arasında farklılık gösteren karmaşık glikanlara (glikoprotein ürünlerine) yol açar (103).

AAKT akciğerde hem makrofajlar hem de alveolar epitel hücresinde üretilmektedir. Akciğerde üretilen antikimotripsinin, antiproteaz etkinliği %15 kadardır. Antiproteaz

etkinliğin daha düşük oluğu karaciğerde üretilen antikomotripsine göre glikolizasyon düzeyinin daha düşük oluğuna bağlanmıştır (104). Bu durum AAKT'nin yarılama ömrünü etkilemektedir. Katepsin G gibi serin proteinazlar geniş bir özgüllüğe sahiptir ve elastin, kolajen tip III ve IV gibi yapısal elementleri parçalama yeteneğine sahiptir. Bu enzimler bakterilerin öldürülmesi için önem arz etmektedir ancak inflamasyona bağlı doku hasarının tekrar şekillendirilmesi için antiproteazlar ile bir denge içerisinde bulunmaları gerekir. Bu aktivite, alt solunum yolu gibi bazı dokuları proteolitik enzimlerin neden olduğu hasarlardan korur. Alfa-1 antitripsin gibi bu proteinin eksikliğinde de kronik obstrüktif akciğer hastalığı gelişebilmektedir (64).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Prematüre bebeklerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan respiratuvar distres sendromu surfaktan eksikliğine bağlı gelişen bir hastalıktır. Azalmış kompliyans ve pulmoner ödemle birlikte alveoller kollaps gelişir. Sonuç olarak alveolar düzeyde gaz değişimi bozulur. Alveolar düzeyde, bazal membrandan ayrılan epitelyum hücrelerinin yerinde hiyalen membranlar oluşmaya başlar. Surfaktan eksikliğiyle birlikte ortaya çıkan enflamatuvar yanıt sendromu, patolojik bulguların gelişmesine yol açan en önemli nedenlerden birisidir. Böylece alveolar alanı çevreleyen parankimde birçok sitokin ve enzim sentezinin katıldığı patolojik tablo gelişir. Bu patolojik bulguların iyileşme sürecinde meydana gelebilecek aksaklıklar ileride solunum problemleri ve oksijen ihtiyacına neden olan bronkopulmoner displazinin (BPD) gelişimine zemin hazırlar. Yenidoğan bebeğin kronik akciğer hastalığı olan BPD, ileri yaşlarda yetişkin kronik akciğer hastalığı (KOA), astım, solunum rezervinde azalma ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarına yatkınlık gibi birçok hastalığa öncülük eder. Bu çalışma ile yenidoğan döneminde prematüre bebekler için önem arz eden RDS hastalığının klinik tanısı, tekrarlayan surfaktan ihtiyacı ve klinik şiddetin değerlendirilmesi amacıyla kan plazmasında CRP, IL-6, fibrinojen, alfa-1 antikom tripsin ve alfa-1 antitripsin düzeyleri araştırılmıştır. Literatürde CRP, IL-6, prokalsitonin gibi birçok akut faz reaktanı ile birlikte tam kan sayımında lökosit sayısı ve I/T oranlarının RDS tanısı ve şiddeti ile ilişkisi araştırılmıştır (105-109). Ancak bu çalışmalarda kesin tanı için bir akut faz reaktanının kullanılması önerilememiştir. Yine kordon kanında AAT düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (110, 111). Bu çalışmalarda prematüre bebeklerin kord kanında AAT düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir ancak rutinde uygulanacak bir tarama yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Ayrıca bronkoalveolar aspirasyon örneklerinde AAT düzeyleri çalışılmıştır (112). Bu yöntem de yenidoğan döneminde RDS tanısı ve takibi açısından kolay olmamakla birlikte solunum sıkıntısını arttırma riski taşımaktadır. Bu çalışmada, özellikle konjenital lobar amfizem, kistik fibrozis, yetişkin akut RDS gelişiminde eksikliği gösterilen alfa-1 antikom tripsin ve alfa-1 antitripsinin yenidoğan dönemindeki plazma düzeyleri ve surfaktan tedavisi sonrasındaki plazmadaki değişimlerinin gösterilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla hastaların tedavi alternatifleri ve süreleri değerlendirilebilecek, prognozları hakkında öngörü sağlanabilecektir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu çalışma için, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 13.12.2017 tarihli 2012-KAEK-15/1555 no'lu karar ile etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmaya Ekim 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında Dr. Sami Ulus Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'ne yatan, çok düşük doğum ağırlıklı (gebelik haftası <32 hafta ve/veya doğum ağırlığı <1500 gram) 59 prematüre bebek alınmıştır. 30 prematüre bebek RDS tablosu gelişen ve surfaktan tedavisi alan çalışma grubudur. Bu hastalardan RDS tanısı aldıktan hemen sonra surfaktan tedavisi verilmeden ilk plazma örneği alınmıştır. İkinci plazma örneği surfaktanın etkinliğinin klinik ve akciğer grafisi ile net olarak değerlendirildiği 6-12 saat sonra alınmıştır. Üçüncü kan örneği ise son surfaktan tedavisinden 24 saat sonra alınmıştır. Diğer 29 hasta kontrol grubu olarak prematüre doğan ancak RDS tablosu gelişmeyen ve surfaktan tedavisi almayan infantlardan oluşmaktadır. Bu bebeklerden yine doğumdan hemen sonra ve postnatal 24. saatte kontrol plazma örneği alınmıştır. Yine kronik anne hastalıkları (maternal diyabet, hipotiroidi, artritler, otoimmün hastalıklar) bulunan bebekler çalışmaya alınmamıştır. Çalışma grupları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

Grup NS1: Surfaktan almayan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri.

Grup NS2: Surfaktan almayan vakalardan doğumdan sonra 24. saatte alınan plazma örnekleri.

Grup S1: Surfaktan alan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri.

Grup S2: Surfaktan alan vakalardan doğumdan 6-12 saat sonra alınan plazma örnekleri.

Grup S3: Surfaktan alan vakalardan son surfaktan tedavisinden 24 saat sonra alınan plazma örnekleri.

Surfaktan tedavisi alan hastalara ilk surfaktan uygulaması 200 mg/kg/doz Proktant Alfa (Curosurf, Chiesi, Italy) olarak yapılmıştır. Tekrarlayan tedaviler yine Proktant Alfa olarak 100 mg/kg/doz uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve tüm örnekler toplanıncaya kadar plazma örnekleri -20°C’de saklanmıştır. IL-6, CRP, fibrinojen düzeyleri hastane laboratuvarında çalışılmıştır. Protein izolasyonu ve western blot deneyleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü’nde yapılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Hastane laboratuvarında plazma örneğini çalışma yöntemleri şu şekildedir.

4.2.1. TAM KAN SAYIMI VE FİBRİNOJEN, IL-6, CRP İFADE ANALİZLERİ

4.2.1.1. Tam Kan Sayımı ve Peirferik Yayma Hazırlanması:

1. Çalışmada tam kan sayımı Abbott CELL-DYN Ruby cihazında (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Santa Clara, CA, USA), Cell-Dyn Ruby Diluent/Sheath Cat.No. 01H73-01, Cell-Dyn Ruby WBC Lyse Cat.No. 08H52-01 ve Cell-Dyn Ruby Hgb/NOC Lyse Cat.No. 03H80-02 reaktifleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
2. Hastaların örnekleri K₂EDTA içeren tam kan tüplerine alındı.
3. Örnek tüpü 6 kere alt üst edilip karıştırıldıktan sonra cihazın örnek probu kullanılarak cihazın dağıtım valfine aspire edildi. Örneğin cihaza pipetlendiği bu basamaktan sonraki tüm aşamalar, cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi.
4. Dağıtım valfi aspire edilmiş örnekten 3 farklı hacimde numune hazırlama işlevini yürütmektedir. Beyaz küre (WBC) sayımı için 20 µL, Kırmızı küre ve Platelet (RBC/PLT) sayımı için 1,67 µL, Hgb düzeyinni tayini için 12 µL numune dağıtım valfi tarafından ayrıştırıldı.
5. RBC/PLT sayımı için ayrılmış olan 1,67 µL hacmindeki kan, RBC karışım odacığında 2.79 mL diluent/sheath reaktifi ile karıştırıldı.
6. Diluent/sheath reaktifi sabit basınç ve hızda okumanın yapıldığı odacık olan optik flow cell’e gönderilmeye başlandı.

7. Eş zamanlı olarak, RBC/PLT sayımı için hazırlanmış olan karışımdan örnek transfer pompası ile 24 μ L alınarak örnek ölçümleme şırıngası ile diluent/sheath reaktifinden daha düşük düzeyde bir sabit basınç ve hızda optik flow cell'e gönderildi.
8. Diluent/sheath'in daha yüksek basınçla gönderilmesi ve optik flow cell'in özel şekli sayesinde RBC/PLT için dilüe edilmiş olan örneğin akımı odaklanarak hücrelerin teker teker sayılabilmesini sağlamaktadır.
9. Flow cell'e bir lazer ışını odaklanmıştır. Flow cell içinden geçen örnek lazer ışını ile kesiştiğinde, saçılan ışık kırmızı küreler için 0° , 10° , 90° , plateletler için 0° ve 10° açılarda yerleştirilmiş algılayıcılardan gelen sinyaller ölçülerek hücre sayımı gerçekleştirildi.
10. Hemoglobin ölçümü için dağıtım valfinden Hgb flow cell'e 12 μ L örnek gönderildi ve burada 1,7 mL diluent ile karıştırıldı.
11. Oluşan karışımın ışık absorbansı Hgb flow cell içinde bulunan düşük enerjili bir LED lamba kullanılarak 555 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen absorbans örneğin hemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.
12. Beyaz kürelerin ölçümü için dağıtım valfinden 20 μ L örnek WBC karışım odasına gönderildi ve burada 0,973 mL WBC lyse reaktifi ile karıştırıldı.
13. Örnek burada 14 saniye bekletilerek örneğin içindeki kırmızı kürelerin parçalanması sağlandı.
14. Bu karışım örnek transfer pompası kullanılarak optik flow cell'e gönderildi.
15. Diluent/sheath reaktifi sabit basınç ve hız altında optik flow cell'e gönderilmeye başlandı.
16. Eş zamanlı olarak, karışımdan 46,5 μ L örnek alınarak örnek ölçümleme şırıngası ile diluent/sheath reaktifinden daha düşük düzeyde bir sabit basınç ve hızda optik flow cell'e gönderildi.
17. Diluent/sheath'in daha yüksek basınçla gönderilmesi ve optik flow cell'in özel şekli sayesinde WBC için dilüe edilmiş olan örneğin akımı odaklanarak hücrelerin teker teker sayılabilmesini sağlamaktadır.
18. Flow cell'e bir lazer ışını odaklanmıştır. Flow cell içinden geçen örnek lazer ışını ile kesiştiğinde, saçılan ışık 4 farklı açıda konumlandırılmış olan algılayıcılar

- aracılığıyla ölçüldü. Karşıda (0° ve 10°) ve yanda (90°ve 90°D) konumlandırılmış algılayıcılardan gelen sinyaller ölçülerek hücre sayımı gerçekleştirildi.
19. Periferik yayma hazırlanması için hastanın tam kan sayımı için alınmış olan kan örneğinden otomatik pipetle (Isolab GMBH, Cat.No. YE191AL) 20 µL kan alınarak rodajlı bir lamın (Paul Marienfield GMBH, Cat.No. 010160) kenarına damlatıldı.
 20. İkinci bir lam alınarak ilk damlanın üzerine gelecek şekilde ilk lamın üzerine çapraz şekilde konumlandırılarak ve lam üzerinde kesintisiz şekilde kaydırılarak kanın yayılması sağlandı.
 21. Rodajlı kısma hastanın adı, dosya numarası ve tarih yazıldı.
 22. Yayma 10 dakika havada kurutuldu.
 23. Kuruyan lamın boyama tepsisine yerleştirilerek üstüne metanol (Sigma-Aldrich, Cat.No.322415-1L) dökülerek hücrelerin lam üzerinde fikse edilmesi sağlandı. Fiksasyon işlemi için 5 dakika beklendikten sonra lamın kenarından tutularak üzerindeki metanol silkelenerek uzaklaştırıldı.
 24. Lamın üzeri Wright-Giemsa boyası (Sigma-Aldrich, Cat.No. 64571-95) ile kaplanarak 3 dakika beklendi.
 25. Boyalı lamın üstüne, boya miktarı kadar saf su dökülerek 6 dakika beklendi.
 26. Lam musluk suyu altında yıkandı ve havada 30 dakika kurumaya bırakıldı.
 27. Kuruyan lamın üzeri lamel ile kapatılarak 400X büyütmede ışık mikroskobu (Olympus CX31, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ile değerlendirildi.
 28. Periferik yaymada beyaz küreler 200 hücre sayılana dek incelendi. Hücrelerin yüzdelik oranları hesaplanarak manuel lökosit formülü ve immatür hücreler değerlendirildi.

4.2.1.2. Fibrinojen test yöntemi (Clauss Yöntemi):

1. Plazma fibrinojen düzeyinin ölçümü Siemens Dade Behring BN II nefelometre cihazı (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd, Erlangen, Almanya) ile Dade Fibrinogen Determination Reagents kiti (Siemens Diagnostics, Cat.No.B4233-15SY) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin içeriğinde trombin reaktifi, fibrinojen standart çözeltisi ve Owren's veronal buffer solüsyonu bulunmaktadır.

2. Clauss yönteminin temeli, dilüe edilmiş plazmada bulunan çözölmüş haldeki fibrinojenin, trombin molekülünün aracılık ettiğı bir tepkime sonucunda çözölemeyen bir polimer haline dönüşerek fibrin pıhtısı oluşturması esasına dayanmaktadır. Dilüe edilmiş plazmanın pıhtılaşma süresi, plazma fibrinojen konsantrasyonu ile ters orantılıdır.
3. Hastanın plazması cihaza yüklendikten sonraki tüm aşamalar cihaz tarafından otomatik olarak gerçekteştirildi.
4. Hastanın plazmasından 20 µL Owren's veronal buffer solüsyonu ile 1:10 oranında dilüe edildi. Toplam örnek hacmi 200 µL oldu.
5. Dilüe edilmiş örnek cihazın içinde yer alan inkübatörlü reaksiyon kuyucuklarının içerisinde 37°C sıcaklıkta 2 dakika boyunca inkübe edildi.
6. İnkübe edilmiş örneğın üstüne 0,1 mL trombin reaktifi eklendi.
7. Trombin reaktifi eklendiğı andan itibaren pıhtılaşma gerçekteşene kadar geçen süre saniye cinsinden ölçüdü.
8. Kitin içerisindeki fibrinojen standart çözeltisinden aynı şekilde yapılmış çalışma sonucunda elde edilmiş olan fibrinojen standart grafiğı kullanılarak, ölçölen pıhtılaşma süresinin hangi fibrinojen konsantrasyonuna karşılık geldiğı hesaplandı.

4.2.1.3. IL-6 test yöntemi:

1. Plazma IL-6 düzeyinin ölçümü Siemens Advia Centaur XP cihazı (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, A.B.D.) ile ADVIA Centaur IL6 Assay kiti (Siemens Diagnostics, Cat.No.10995080) kullanılarak gerçekteştirildi. Kitin içeriğinde Lite reagent, Solid Phase Reagent ve kalibratör bulunmaktadır.
2. Lite reagent monoklonal IL-6 antikorunu içerirken, solid phase reagent içerisinde anti-IL-6 monoklonal antikorlarıyla kaplanmış paramanyetik partiküller bulunmaktadır.
3. Testin yöntemi kemiluminesans teknolojisini kullanan tam otomatize, tek basamaklı direk immünoassaydır. Kemiluminesans tepkimesiyle açığa çıkan ışımının şiddeti, örnekteki IL-6 konsantrasyonuyla orantılıdır.
4. Hastanın plazması cihaza yüklendikten sonraki tüm aşamalar cihaz tarafından otomatik olarak gerçekteştirildi.
5. Hastanın plazmasından 50 µL reaksiyon küvetine pipetlendi.

6. 140 µL Solid phase reagent ve 100 µL Lite reagent eklenerek 37°C sıcaklıkta 7,5 dakika inkübe edildi.
7. Solid phase paramanyetik özelliği sayesinde karışımdan ayrılarak bağlanmamış reaktifler yıkama ile ortamdan uzaklaştırıldı.
8. Kemiluminesans tepkimesini başlatmak için cihazın içinde yer alan asit ve baz reaktiflerinin her birinden 300 µL pipetlendi.
9. Tepkime sonucunda ortaya çıkan ışımının şiddeti ölçüldü.
10. Kitin içinde yer alan ve daha önce uygulanmış olan kalibratör reaktifi sayesinde hesaplanmış olan temel reaksiyon eğrisi kullanılarak örneğin ışıma şiddetinden IL-6 konsantrasyonu hesaplandı.

4.2.1.4. CRP test yöntemi (Nefelometrik Yöntem):

1. CRP düzeyinin ölçümü Siemens Dade Behring BN II nefelometre cihazı (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd, Erlangen, Almanya) ile CardioPhase hsCRP kiti (Siemens Diagnostics, Cat.No.OQIY) kullanılarak gerçekleştirildi.
2. Hastanın plazması cihaza yüklendikten sonraki tüm aşamalar cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi.
3. Kit içinde bulunan insan CRP molekülüne spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış polistiren partiküller, hastanın plazması ile aynı test kuyucuğunda 6 dakika boyunca inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonucunda plazmadaki CRP, antikor kaplı polistiren partikülleriyle birleşerek agregatlar meydana getirdi. Bu agregatlar örnekten geçirilen bir ışık demetinin dağılmasına yol açtı.
5. Dağılan ışığın şiddeti örnekte bulunan CRP moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılıdır.
6. Elde edilen sonuç, konsantrasyonu bilinen bir CRP standardı ile karşılaştırılarak örnekteki CRP miktarı belirlendi.

4.2.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Western Blot (WB) deneyleri için gruptaki plazma örneklerinin her birinden 2 µL alınarak havuzlama işlemi yapılmıştır. Plazma örnekleri, 20.000 g, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra lipid tabakasının altında kalan berrak kısım, protein analizlerinde

kullanılmak üzere, temiz bir tüpe aktarıldı. Protein karışımında bulunan total protein miktarının hesaplanmasında; Bradford yöntemi kullanılmıştır ve ELISA okuyucu (Perkin Elmer Victor V) ile örneklerdeki toplam protein miktarı mikrolitrede bulunan mikrogram protein olarak belirlenmiştir. Protein miktarlarının belirlenmesinde standart olarak sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma-Aldrich-A7906) kullanılmıştır. Protein miktarının tespit edilmesinde şu basamaklar yer almaktadır:

1. Blank için, distile su (MilliQ saf su sistemi, Millipore) 3 tekrar 5'er µL olacak şekilde ELISA plakası kuyucuklarına yüklendi.
2. BSA standartları 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml şeklinde hazırlanarak, 3 tekrar şeklinde 5'er µL ELISA plakası kuyucuklarına yüklendi.
3. Protein karışımları 1/40 sulandırma ile 3 tekrar olarak 5'er µL yüklendi.
4. Tüm örneklerin üzerine 245 µL Bradford solüsyonu (Bio-Rad, 5000205) konuldu ve örnekler 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Plaka ELISA okuyucusuna yerleştirildi ve 595 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak, protein miktarları belirlendi.

4.2.3. WESTERN BLOTLAMA

Protein izolasyonu ve toplam protein miktar tayinleri yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirilen surfaktan alan ve almayan hasta örneklerinde, alfa-1 antitripsin (AAT, Santa Cruz, 59438) ve alfa-1 antikimotripsin (AAKT, Santa Cruz, 59430) proteinlerinin ifadelerinin gösterilmesi için western blot uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Western Blot çalışmalarında yarı kuru transfer sistemi (Bio-Rad, Trans-Blot Turbo Transfer System) kullanılmış olup, bant görünürlüğü için kemiluminisans özellikte substrat (Thermo Scientific, SuperSignal West Femto, 34096) kullanılarak Odyssey Fc (LI-COR Biosciences) sisteminde membranlar görüntülenmiştir. Western Blot analizlerinde yükleme kontrolü olarak β- aktin (Cell Signaling Technology, 4967) kullanılmıştır. Western blotlama protokolü ile ilgili uygulamalar aşağıda detaylandırılmıştır.

4.2.3.1. SDS PAGE Hazırlama Protokol:

Örnekler, aşağıda yer alan protokol ile hazırlanan %4'lük toplama ve %10'luk ayırma jellerine 50 µg protein/kuyucuk olacak şekilde yüklenmiştir.

1. %10'luk taze APS (Applichem, A2941) hazırlandı.
2. %10'luk jel için gerekli hacimlerde distile su, Tris-HCl (Sigma, 10812846001) tamponu ve akrilamid/bis (%40) (Fisher Scientific, BP1408-1) solüsyonu karıştırıldı.
3. Ayırma jeli solüsyonuna APS ve TEMED (Sigma, T7024) eklendikten sonra yavaşça karıştırılıp uygun düzende konumlandırılmış camların arasına döküldü ve bunun üzeri %20'lik izopropanol (Sigma, 563935) ile kapatıldı.
4. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol döküldü, distile su ile yıkandı, kurutuldu.
5. Toplama jeline APS ve TEMED ilave edildi ve polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine ilave edildi.
6. 10 kuyucuklu tarak jel üzerine yerleştirildi.
7. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarıldı, jeller kasetlere yerleştirilip tankın içine alındı.
8. Üzerlerine yürütme tamponu eklendi.

4.2.3.2. Jellere yüklenecek örneklerin hazırlanması

1. Her grup 50 µg protein/kuyucuk olacak şekilde yükleme tamponu ve indirgen ile karıştırıldı ve 95°C'de 5 dakika ısıtıldı.
2. Daha sonra kuyucuklara yüklendi. Protein standardı olarak Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, 1610373) kullanıldı.
3. Jeller, sabit voltajda (100 V) yürütüldü.
4. Yürümesi tamamlanan jeller kaplara alınarak membrana aktarma aşamasına geçildi.

4.2.3.3. Western Blot transfer protokolü

1. İki adet PVDF membran jelin boyutlarına uyacak şekilde kesildi ve 3 dakika %100 metanol (Merck, 103009) ile çalkalayıcı içinde inkübe edildi.
2. Membran ve yürümesi sonuçlanan jeller 15 dakika 1X Towbin transfer tamponu (10X'lik 30.3 g Tris, 144 g Glycine, 20 ml %10 SDS karışımı, 1X'e seyreltilerek hazırlandı.) kullanılarak çalkalayıcı içinde yıkandı.
3. Membran jel sandviç yöntemi ile western blot transfer cihazına (Bio-Rad, Trans-Blot Turbo Transfer) yüklendi. İşlem aşamaları:

- ✓ Bir adet transfer kağıdı transfer tamponuyla ıslatıldı. Üzerine membran konuldu.
 - ✓ Membran üzerine jel düzgün bir şekilde yerleştirildi ve yine bir adet ıslatılmış transfer kağıdı konuldu.
 - ✓ Hava kabarcığı kalmaması için her aşamada silindir ile düzleştirildi.
4. Sistem hazır olduktan sonra, cihazda 25 V, 1.0A'de 30 dakika süre ile aktarma yapıldı.
 5. Proteinlerin transfer edildiği membranlar %5 BSA'lı TBST tamponu (10X'lik TBS stoğu 24.23 g Trizma-HCl ve 80,06 g NaCl ile hazırlandıktan sonra, 1X'e seyreltildi ve son hacim oranı %0.05 (v/v) olacak şekilde Tween 20 koyuldu.) içinde 90 dakika oda sıcaklığı altında çalkalayıcı içinde bloklandı.
 6. Bloklama tamponu (TBST içine %5 (w/v) oranında BSA koyuldu.) dökülerek, membran bir kez beş dakika çalkalayıcı içinde TBST ile yıkandı.
 7. AAT (Santa Cruz, 59438) ve AAKT (Santa Cruz, 59430) primer antikorları bloklama tamponu ile 1:400 oranında seyreltildi ve membranlar primer antikor solüsyonları içinde +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
 8. İnkübasyon sonrası membranlar 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda yıkandı.
 9. Anti-mouse ikincil antikor (Cell Signaling, 7076S) bloklama tamponu içinde 1:3000 oranında seyreltildi ve membranlar bir saat çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona alındı.
 10. İnkübasyon sonrası membranlar 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda yıkandı.
 11. SuperSignal West Femto (ThermoScientific, 34096) solüsyonu ile inkübe edilen membranlar Odyssey Fc (LI-COR Biosciences) cihazında görüntülendi.
 12. Görüntüsü alınan jeller β -Aktin doğrulama proteini çalışması için yıkama tamponuna alındı.
 13. Daha sonra beşinci maddedeki bloklama aşamasından itibaren tüm aşamalar β -Aktin doğrulama proteini için de tekrar edildi.

4.2.4. ALFA-1 ANTİTRİPSİN VE ALFA-1 ANTİKİMOTRİPSİN PROTEİNLERİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE ANALİZ PROTOKOLÜ

1. Çalışmada alfa-1 antitripsin için BT-LAB, Cat.No. E0753Hu ve alfa-1 antikimotripsin için de BT-LAB, Cat.No. E1073Hu ELISA kitleri kullanılmıştır.

2. Kit içeriğinde bulunan tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler oda sıcaklığına geldikten sonra çalışmaya başlandı.
3. 96 kuyucuk bulunan plate üzerindeki belirlenen 6 kuyucuğa 50 µl standartlar, kalan kuyucuklara 40 µl numunelerden pipetlendi.
4. Numune kuyucuklarına 10 µl biotinli antibody pipetlendi, standart solüsyonunda antibody bulunduğu için standart kuyucuklarına antibody eklenmedi.
5. Tüm kuyucuklara (standart ve sample) 50 µl HRP pipetlendi (Blank hariç).
6. Plate'in üzeri koruyucu film ile kaplanarak 60 dk 37° C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra film çıkartılarak her kuyucuğa 350 µl yıkama tamponu olacak şekilde 5 kez arka arkaya otomatik yıkama cihazında (Auto Strip Washer, BIO-TEK EL X 50) yıkama işlemi yapıldı.
8. Yıkama işleminden sonra plate üzerinde bulunan tüm kuyucuklara substrat solüsyonu A ve B den sırasıyla 50'şer µl pipetlendi.
9. Plate filmle kaplanarak tekrar 10 dk 37° C'de inkübe edildi.
10. İnkübasyondan sonra film çıkartılarak tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenerek mavi renk olan kuyucuklardaki reaksiyon durduruldu ve kuyucukların renginin sarıya dönmesi gözlemlendi.
11. Bu aşamadan sonra 450 nm'de microplate reader cihazında (BIO-TEK EL X 800) plate kuyucuklarının okuması yapılarak absorbansları ölçüldü.
12. Alınan absorbanslardan blank değeri çıkartılarak standartların absorbans değerleri ile sonuçlar hesaplandı.

Çalışmada demografik bilgiler, perinatal komplikasyonlar, vakaların tam kan sayımı ve surfaktan tedavi sayıları kaydedilmiştir. Tüm vakaların doğum kilosu, gebelik haftası, doğum şekli, antenatal steroid kullanımı, cinsiyet, Apgar skorları, tam kan sayımı değerlerinden Hb değeri, beyaz küre (WBC), trombosit sayısı (PLT), immatür /total lökosit oranı (I/T) sayısal değerleri kaydedilmiştir. Her iki grupta herhangi bir antenatal ve/veya natal enfeksiyon (idrar yolu enfeksiyonu, koryoamniyonit) bulunmamaktaydı.

4.2.5. İSTATİSTİK ANALİZİ

Çalışmadaki veri analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows 22 (SPSS inc. Chicago, Illinois, USA) paket programı ile yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik yapılırken, normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, normal olmayan dağılım gösteren değişkenler için medyan (min – maks), kategorik değişkenler ifade edilirken vaka sayısı ve yüzde (%) olarak belirtilmiştir. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği *t* testi ile gösterilirken, ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır. Kategorik değişkenler değerlendirilirken Pearson Ki-Kare veya Fisher exact testi kullanılmıştır.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. TAM KAN SAYIMI VE FİBRİNOJEN, IL-6 VE CRP İFADELERİNE AİT BULGULAR

Surfaktan tedavisi alan vakaların cinsiyet dağılımı E/K: 19/11 iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin cinsiyet dağılımı E/K: 19/10 idi ($p=0,86$).

Surfaktan tedavisi alan vakaların doğum kilosu ortalaması $1899,17 \pm 691$ gr (700gr-3000gr) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin doğum kilosu ortalaması $2115,69 \pm 423$ gr (1240gr-2960gr) idi ($p=0,15$). Surfaktan tedavisi alan vakaların gebelik haftası ortalaması 31 ± 2 hafta (25 hafta-36 hafta) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin gebelik haftası ortalaması 33 ± 5 hafta (29 hafta-36 hafta) idi ($p=0,01$)(Çizelge 5.1).

Surfaktan tedavisi alan vakaların anne yaşı ortalaması $24,87 \pm 5$ yıl (17yıl-38yıl) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin anne yaşı ortalaması $28,52 \pm 5,6$ yıl (20yıl-38yıl) idi ($p=0,20$).

Çizelge 5. 1. Gruplar arası doğum kilosu, gebelik haftası ve anne yaşı karşılaştırması.

	Surfaktan Alan Grup Ortalama $\pm$ Standart Sapma (Min-Maks)	Surfaktan Almayan Grup Ortalama $\pm$ Standart Sapma (Min-Maks)	p Değeri
Doğum Kilosu	$1899,17 \pm 691$ gr (700gr-3000gr)	$2115,69 \pm 423$ gr (1240gr-2960gr)	0,15
Gebelik Haftası	31 ± 2 hafta (25 hafta-36 hafta)	33 ± 5 hafta (29 hafta-36 hafta)	0,01
Anne Yaşı	$24,87 \pm 5$ yıl (17yıl-38yıl)	$28,52 \pm 5,6$ yıl (20yıl-38yıl)	0,20

Surfaktan tedavisi alan vakalarda sezaryen doğum 30/30 (%100) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin sezaryen doğum oranı 22/29 (%75) idi ($p=0,05$).

Surfaktan tedavisi alan vakalarda IVF gebelik (tüp bebek) 3/30 (%10) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin IVF gebelik oranı 7/29 (%24) idi ($p=0,18$).

Surfaktan tedavisi alan vakalarda SGA (haftasına göre küçük) doğum oranı 3/30 (%10) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin SGA doğum oranı 4/29 (%14) idi

(p=0,70). Surfaktan tedavisi alan vakalarda antenatal steroid kullanım oranı 0/30 (%0) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerde antenatal steroid kullanım oranı 12/29 (%41,4) idi (p<0,001) (Çizelge 5.2).

Çizelge 5. 2. Gruplar arası perinatal risk faktörlerinin karşılaştırılması.

	Surfaktan Alan Grup Oran (%)	Surfaktan Almayan Grup Oran (%)	p Değeri
E/K (Cinsiyet)	19/11	19/10	0,86
Sezaryen Doğum	30/30 (%100)	22/29 (%75)	0,05
IVF Gebelik	3/30 (%10)	7/29 (%24)	0,18
SGA Doğum	3/30 (%10)	4/29 (%14)	0,70
Antenatal Steroid	0/30 (%0)	12/29 (%41,4)	<0,001

Surfaktan tedavisi öncesinde hastalardan alınan tam kan örneklerinden Hb (hemoglobin), WBC (lökosit), PLT (trombosit) ve I/T (immatür/total lökosit oranı) değerleri karşılaştırıldığında;

Surfaktan tedavisi alan vakaların WBC sayısı ortalaması $10760 \pm 5029 / \text{mm}^3$ ($4240 / \text{mm}^3$ - $25640 / \text{mm}^3$) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin WBC sayısı ortalaması $11971 \pm 6382 \text{mm}^3$ (3800mm^3 - 31000mm^3) idi (p=0,37).

Surfaktan tedavisi alan vakaların Hb ortalaması $14,85 \pm 2,4 \text{gr/dL}$ ($9,3 \text{gr/dL}$ - $18,3 \text{gr/dL}$) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin Hb ortalaması $16,11 \pm 3,6 \text{ gr}$ ($8,7 \text{ gr/dL}$ - $25,3 \text{gr/dL}$) idi (p=0,11).

Surfaktan tedavisi alan vakaların PLT sayısı ortalaması $237166,6 \pm 71650,5 / \text{mm}^3$ ($117000 / \text{mm}^3$ - $382000 / \text{mm}^3$) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin PLT sayısı ortalaması $260586,2 \pm 103048,3 / \text{mm}^3$ ($72000 / \text{mm}^3$ - $557000 / \text{mm}^3$) idi (p=0,31).

Surfaktan tedavisi alan vakaların I/T oranı ortalaması $0,34 \pm 0,1$ (0,20-0,70) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin I/T oranı ortalaması $0,18 \pm 0,1$ (0,10-0,30) idi (p=<0,001)(Çizelge 5.3).

Çizelge 5. 3. Gruplar arası tam kan sayımı değerlerinin karşılaştırılması.

	Surfaktan Alan Grup Ortalama±Standart Sapma (Min-Max)	Surfaktan Almayan Grup Ortalama±Standart Sapma (Min-Max)	p Değeri
WBC Sayısı	10760±5029/mm ³ (4240/mm ³ -25640/mm ³)	11971±6382 mm ³ (3800 mm ³ -31000 mm ³)	0,37
Hb Değeri	14,85±2,4gr/dL (9,3gr/dL-18,3gr/dL)	16,11±3,6 gr (8,7 gr/dL-25,3gr/dL)	0,11
PLT Sayısı	237166,6±71650,5/mm ³ (117000/mm ³ -382000/mm ³)	260586,2±103048,3/mm ³ (72000/mm ³ -557000/mm ³)	0,31
I/T Oranı	0,34±0,1 (0,20-0,70)	0,18±0,1 (0,10-0,30)	<0,001

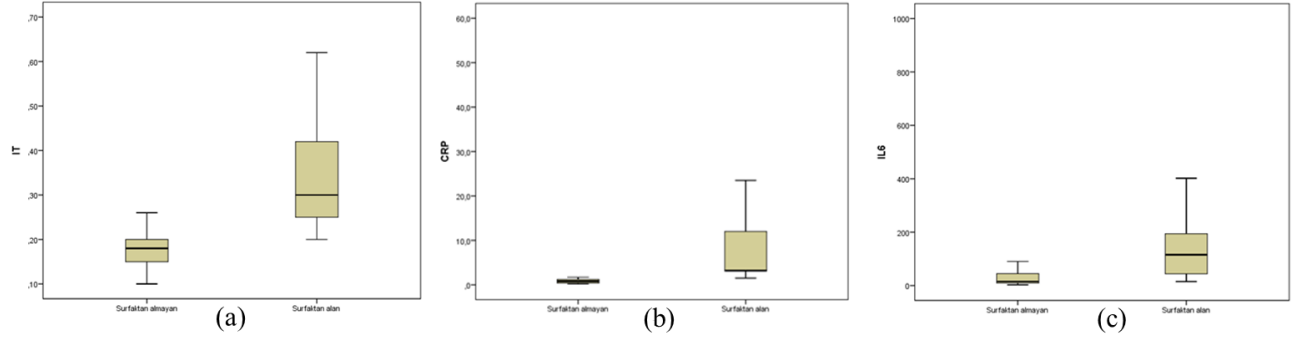
Apgar skoru yenidoğan bebeğin doğum sonrası birinci, beşinci ve onuncu dakikalarda solunum sağlaması için acil girişim gerekliliğini tespit etmek amacıyla geliştirilen bir skora sistemidir. Apgar skoru; her biri 0,1 ve 2 puan alabilen bebekte renk, kalp hızı, refleksler, kas tonusu ve solunumun değerlendirilmesinden oluşur. Sekiz ve üzeri puan alan bebeklerin prognozu iyi olarak değerlendirilir. Surfaktan tedavisi almayan vakaların 5. dakika Apgar skorlamasında 1 bebek sekizin altında Apgar skoruna sahip iken, surfaktan tedavisi alan prematüre bebeklerin 7'sinde sekizin altında Apgar skoru tespit edilmiştir (p=0,52). Onuncu dakika Apgar skorlamasında her iki gruptaki hastaların tamamı 8 ve üzeri puan almıştır.

RDS kliniğinin şiddetini belirlemek amacıyla surfaktan alan ve almayan gruplarda I/T oranı, CRP, IL-6 ve fibrinojen düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Surfaktan tedavisi alan vakaların I/T oranı ortalaması 0,34±0,1 (0,20-0,70) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin I/T oranı ortalaması 0,18±0,1 (0,10-0,30) idi (p<0,001) (Şekil 5.1).

Surfaktan tedavisi alan vakaların plazma CRP ortalaması 7,44±3,18mg/L (1,5 mg/L - 27,8mg/L) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma CRP ortalaması 3,59±10,47 mg/L (2 mg/L -51 mg/L) idi(p<0,001) (Şekil 5.1).

Surfaktan tedavisi alan vakaların plazma IL-6 ortalaması 167,45±195pg/mL (15pg/mL- 925pg/mL) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma IL-6 ortalaması 40,03±75pg/mL (3pg/mL-408pg/mL) idi(p<0,001) (Şekil 5.1).

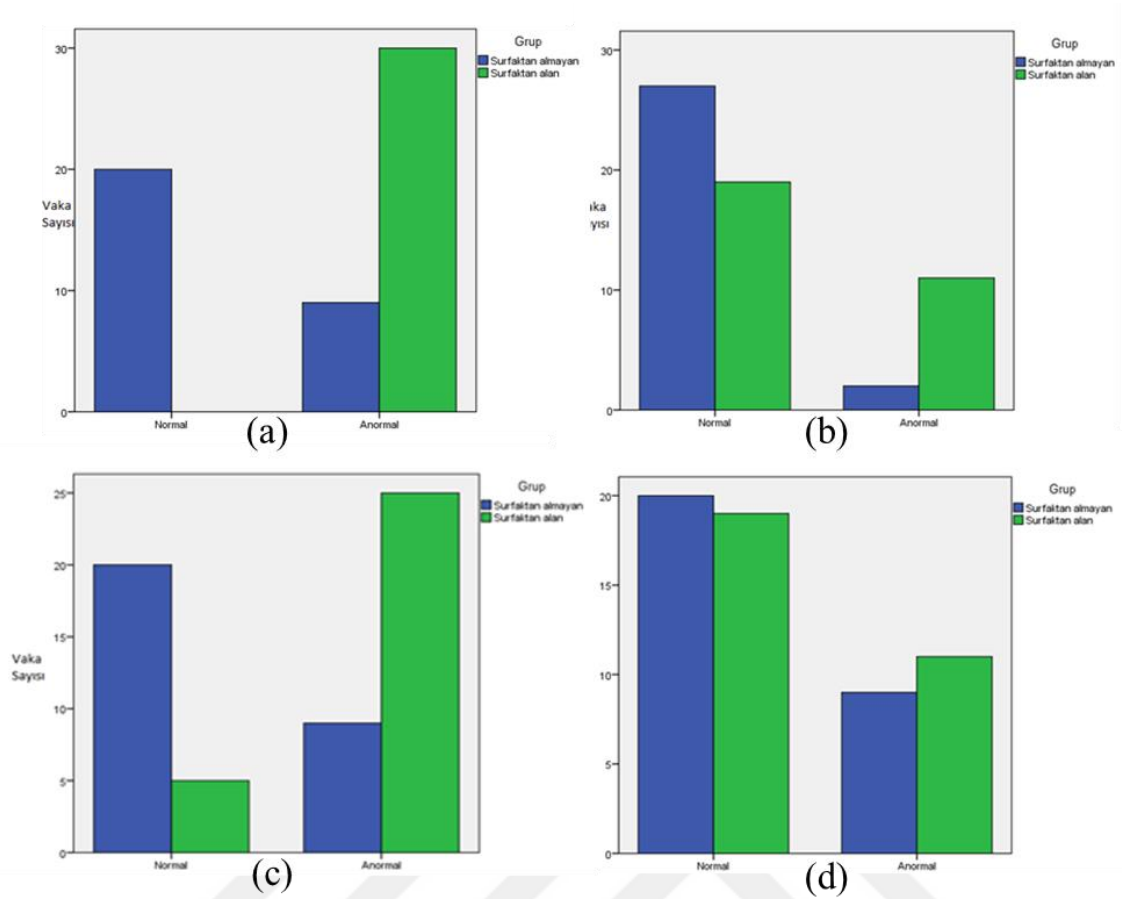


Şekil 5. 1. Surfaktan alan grup ile surfaktan almayan grubun (a) I/T oranları dağılımı, (b) CRP değerleri dağılımı, (c) IL-6 değerleri dağılımı.

Surfaktan tedavisi alan vakaların plazma fibrinojen ortalaması $128,87 \pm 63,02 \text{ mg/dL}$ (19 mg/dL-257 mg/dL) iken, surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma fibrinojen ortalaması $141,31 \pm 90,63 \text{ mg/dL}$ (28 mg/dL-430 mg/dL) idi ($p = 0,87$). Ayrıca I/T oranı ve CRP, IL-6, fibrinojen düzeylerinin referans değerleri göz önüne alındığında; surfaktan alan grupta vakaların tamamında I/T oranı 0,2 üzerinde iken, surfaktan almayan grupta 9/29 (%31) oranında 0,2'nin üzerindeydi ($p < 0,001$).

Surfaktan alan grupta CRP değeri 8 mg/L üzerinde olan 2/30 (%6) hasta varken, surfaktan almayan grupta CRP değeri 8 mg/L üzerinde olan 11/29 (%37) hasta vardı ($p = 0,006$). Surfaktan alan grupta IL-6 değeri 23 pg/mL üzerinde olan 25/30 (%83) hasta varken, surfaktan almayan grupta IL-6 değeri 23 pg/mL üzerinde olan 9/29 (%31) hasta vardı ($p < 0,001$).

Surfaktan alan grupta fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde olan 11/30 (%36) hasta varken, surfaktan almayan grupta fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde olan 9/29 (%31) hasta vardı ($p = 0,78$) (Şekil 5.2).

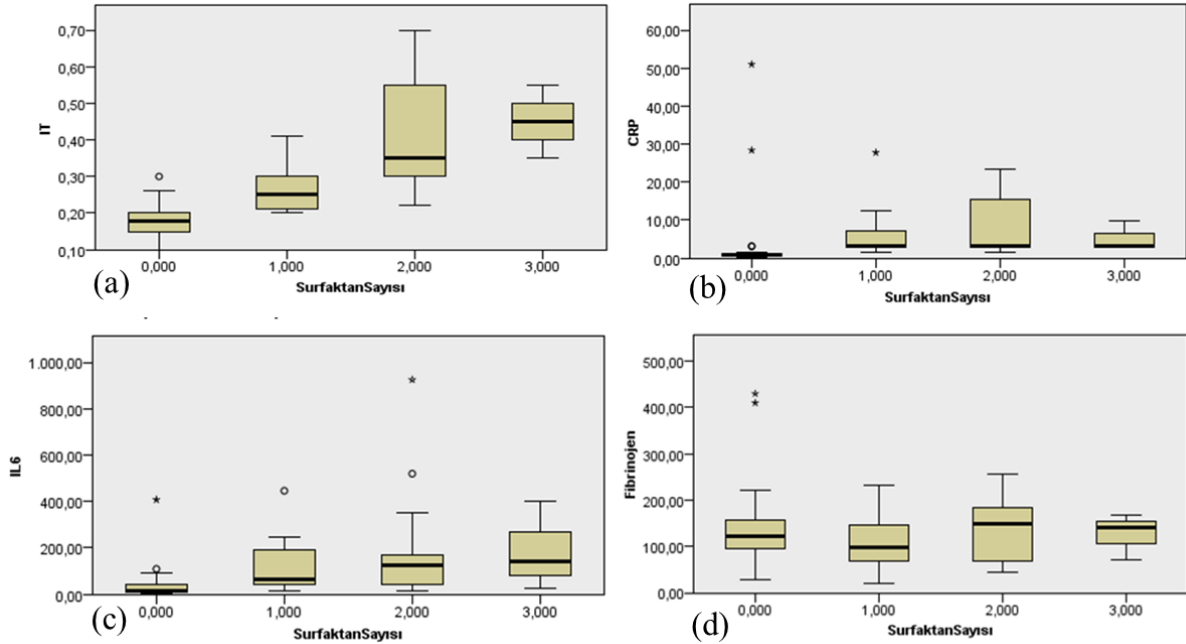


Şekil 5. 2. Surfaktan alan grup ile surfaktan almayan grupta I/T oranı 0,2 üzerinde olan vakaların dağılımı (a), CRP değeri 8 mg/L üzerinde olan vakaların dağılımı (b), IL-6 değeri 23 pg/mL üzerinde olan vakaların dağılımı (c), fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde olan vakaların dağılımı (d). (Grafiklerde normal ile gösterilen gruplar referans değerleri arasındaki sonuçları, anormal ile gösterilen gruplar ise referans değerlerinin üzerinde olan sonuçları ifade etmektedir.)

Surfaktan tedavisi alan hastalar aldıkları tekrarlayan surfaktan sayısına göre; tek doz alan (Hafif RDS), iki doz alan (Orta RDS) ve üç doz alan (Ağır RDS) olarak sınıflandırıldığında, RDS şiddeti arttıkça I/T oranı, CRP ve IL-6 değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı artışı görülmüştür ($p < 0,001$) (Çizelge 5.4). Fibrinojen değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmemiştir ($p = 0,77$) (Şekil 5.3).

Çizelge 5. 4. Surfaktan alan vakalarda surfaktan tedavisi sayısı arttıkça (RDS şiddeti arttıkça) I/T oranı, CRP, IL-6 ve fibrinojen değerlerinin değişimi.

	Surfaktan Almayan Vakalar (n=29) Ortalama±Standart Sapma (Min-Maks)	Bir Doz Surfaktan Alan Vakalar (n=13) Ortalama±Standart Sapma (Min-Maks)	İki Doz Surfaktan Alan Vakalar (n=14) Ortalama±Standart Sapma (Min-Maks)	Üç Doz Surfaktan Alan Vakalar (n=3) Ortalama±Standart Sapma (Min-Maks)	P Değeri
I/T Oranı	0,18±0,04 (0,10-0,30)	0,28±0,06 (0,20-0,42)	0,40±0,15 (0,22-0,75)	0,45±0,10 (0,35-0,55)	<0,001
CRP	3,59±10,47 mg/L (2 mg/L -51 mg/L)	5,38±3,76 mg /L (1,7 mg /L -27 mg/L)	9,11±7,99 mg /L (2,5 mg /L -24 mg/L)	6,14±7,18 mg /L (3,20 mg/L -29 mg/L)	<0,001
IL-6	40,03±75 pg /mL (3 pg /mL -408 pg/mL)	125,80±123 pg/mL (16 pg /mL -446 pg/mL)	201,51±249 pg/mL (15 pg /mL -925 pg/mL)	189±193 pg /mL (25 pg /mL -402 pg/mL)	<0,001
Fibrinojen	141,31±90,63 mg/dL (28 mg/dL -430 mg/dL)	118,46±67,05 mg/dL (19 mg/dL-232 mg/dL)	139,31±63,99 mg/dL (45 mg /dL-257 mg /dL)	126±50,48 mg/dL (70 mg /dL-168 mg/dL)	0,77



Şekil 5. 3. RDS şiddetindeki artış ile I/T oranındaki değişim (a), CRP değerlerindeki değişim (b), IL-6 değerlerindeki değişim (c), fibrinojen değerlerindeki değişim (d).

5.2. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ BULGULARI

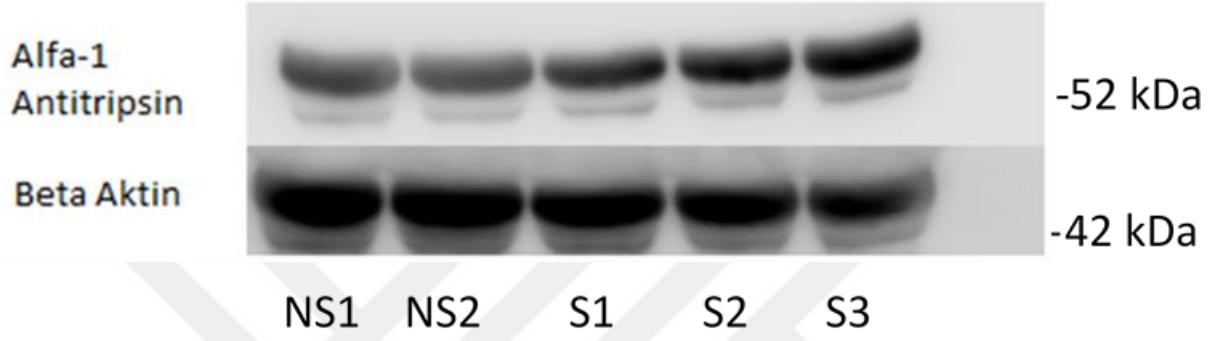
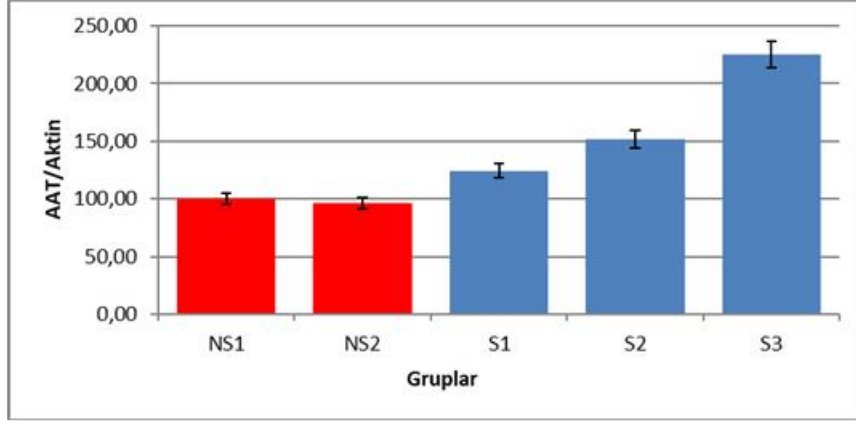
Bradford yöntemi ile ELISA okuyucu cihazı (Perkin Elmer Victor V) kullanılarak tespit edilen toplam protein miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protein) Çizelge 5.5’de verilmiştir.

Çizelge 5. 5. Deney gruplarına ait protein miktarları.

Deney Grupları	Protein Miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
NS1	34,75
NS2	35,47
S1	26,85
S2	26,03
S3	27,31

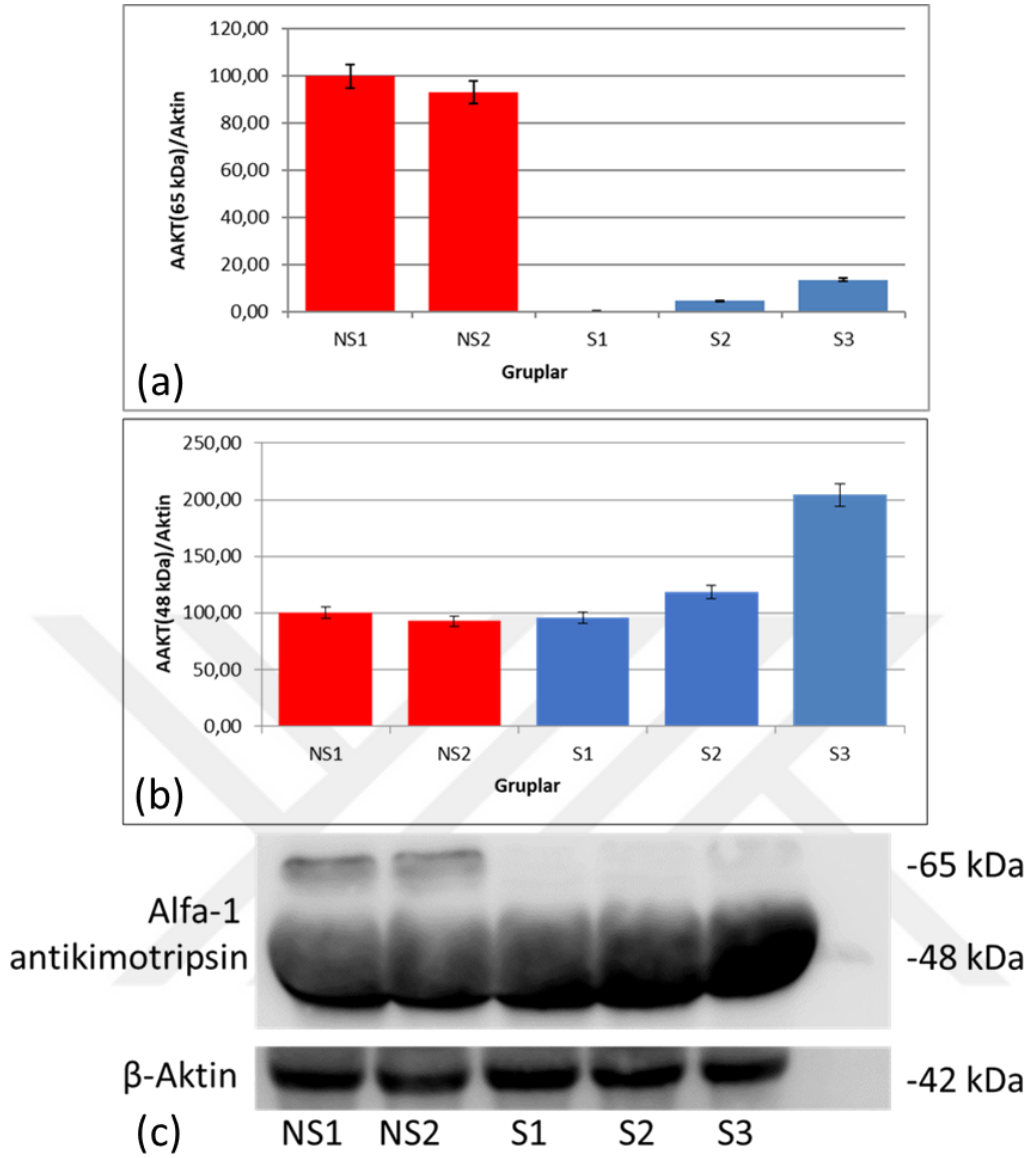
5.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI

Alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsin ve β -aktin (yükleme kontrolü) proteinlerine ait western blot deneyleri ile elde edilen bant görüntüleri Şekil 5.4 ve 5.5’te verilmektedir. Vakaların surfaktan tedavisinden sonra 6-12 saat aralığında ve 24 saat sonrasında alınan plazma örneklerinin western blot görüntülemesinde alfa-1 antitripsin düzeyinde tedavi öncesine göre artış tespit edilmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5. 4. Alfa-1 antitripsin ve β -aktin proteinlerinin gruplar arasındaki ifade farklılıklarının western blot görüntüsü ile gösterilmesi. (a) Alfa-1 antitripsin/ β -aktin (yükleme kontrolü) ifade değerlerine ait grafik, (b) Alfa-1 antitripsin ve β -aktin bantlarına ait görüntü. (Deney grupları: NS1: Sürfaktan almayan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri, NS2: Sürfaktan almayan vakalardan doğumdan sonra 24. saatte alınan plazma örnekleri, S1: Sürfaktan alan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri, S2: Sürfaktan alan vakalardan doğumdan 6-12 saat sonra alınan plazma örnekleri, S3: Sürfaktan alan vakalardan son surfaktan tedavisinden 24 saat sonra alınan plazma örnekleri).

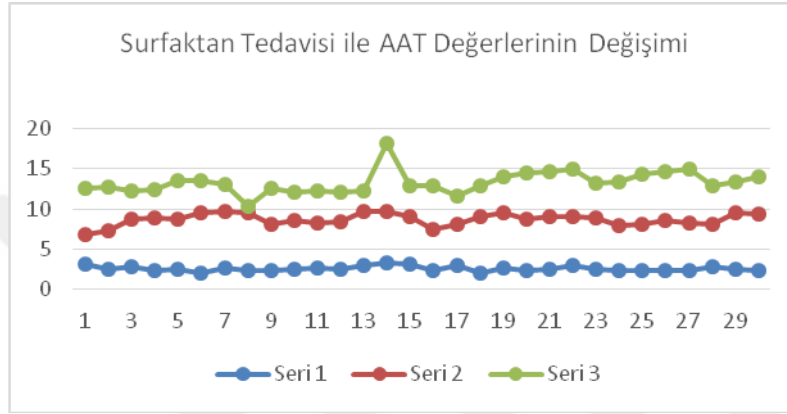
Vakaların surfaktan tedavisinden sonra 6-12 saat aralığında ve 24 saat sonrasında alınan plazma örneklerinin western blot görüntülemesinde alfa-1 antikimotripsin 48 kDa'luk izoformunun ifade düzeyinde tedavi öncesine göre artış tespit edilirken, 65 kDa'luk izoformunun ifade düzeyinde tedavi öncesine göre azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5. 5. Alfa-1 antikimotripsinin western blot görüntüsü. ve β -aktin proteinlerinin gruplar arasındaki ifade farklılıklarının western blot ile gösterilmesi. (a) Alfa-1 antikimotripsin (65 kDa)/ β -aktin (yükleme kontrolü) ifade değerlerine ait grafik, (b) Alfa-1 antikimotripsin (48 kDa)/ β -aktin (yükleme kontrolü) ifade değerlerine ait grafik (c) Alfa-1 antikimotripsin ve β -aktin bantlarına ait görüntü. (Deney grupları: NS1: Sürfaktan almayan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri, NS2: Sürfaktan almayan vakalardan doğumdan sonra 24. saatte alınan plazma örnekleri, S1: Sürfaktan alan vakalardan doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri, S2: Sürfaktan alan vakalardan doğumdan 6-12 saat sonra alınan plazma örnekleri, S3: Sürfaktan alan vakalardan son surfaktan tedavisinden 24 saat sonra alınan plazma örnekleri).

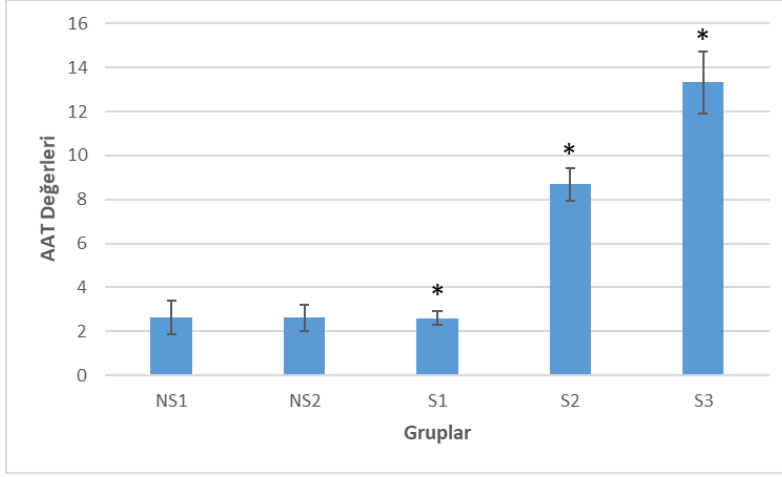
5.4. ALFA-1 ANTİTRİPSİN VE ALFA-1 ANTİKİMOTRİPSİN PROTEİNLERİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE ANALİZ BULGULARI

Alfa-1 antitripsin (BT-LAB, Cat.No. E0753Hu) ticari ELISA kitleri ile surfaktan alan ve almayan hasta gruplarına ait analiz bulguları Şekil 5.6 'da verilmiştir.



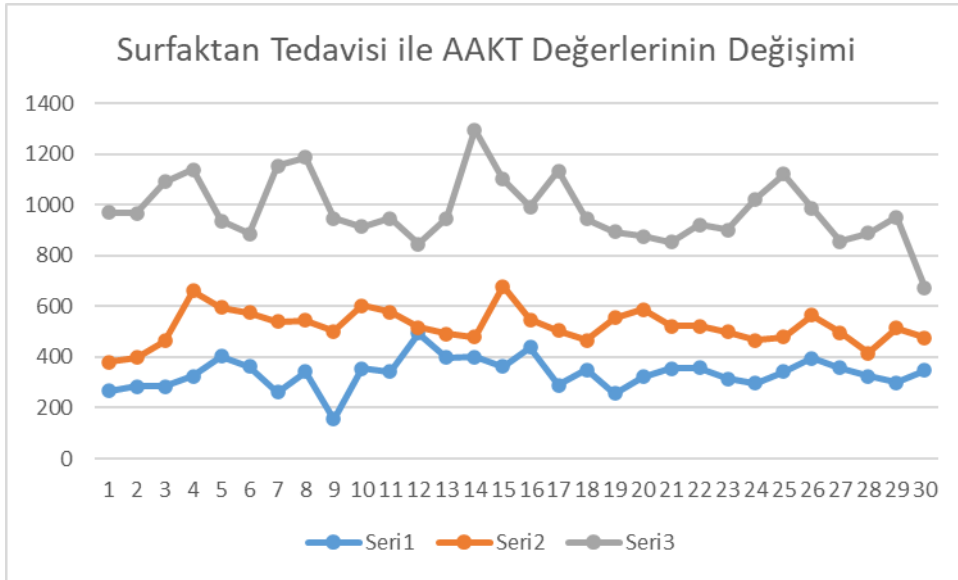
Şekil 5. 6. Surfaktan tedavisi ile birlikte hastalardaki alfa-1 antitripsinin düzeyinin dağılımı. Seri 1: Surfaktan tedavisi öncesi vakaların AAT değerleri. Seri 2: Surfaktan tedavisi sonrasında 6-12. saatler arasında vakaların AAT değerleri. Seri 3: Surfaktan tedavisinden 24 saat sonrasında vakaların AAT değerleri (ELISA Deney Sonuçları).

ELISA deneyi sonuçlarına göre, surfaktan tedavisi sonrası, alfa-1 antitripsinin ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Sonuçlara göre, surfaktan uygulamasından sonra hem 6-12 saat, hem de 24 saat sonrasında, uygulama öncesine göre AAT ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, uygulama sonrası 6-12. saat ve 24. saat sonuçları karşılaştırıldığında da gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.7).



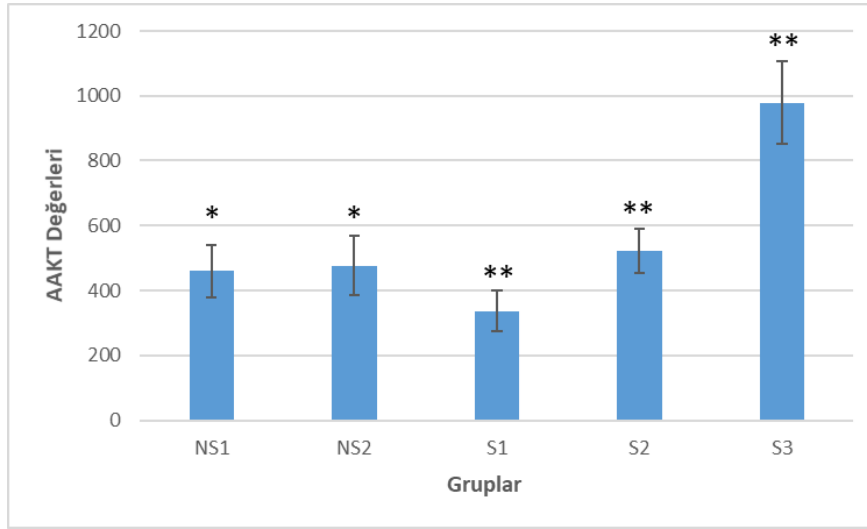
Şekil 5. 7. Alfa-1 antitripsinin surfaktan tedavisi ile birlikte gruplar arasındaki değişimi. (Surfaktan tedavisi almayan grupta doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri ile 24 saat sonrasında alınan plazma örneklerindeki AAT düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Surfaktan tedavisi alan grupta, tedavi sonrasında 6-12 saat aralığında ve 24 saat sonrasında alfa-1 antitripsin düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir).

Alfa-1 antikimotripsin (BT-LAB, Cat.No. E1073Hu) ticari ELISA kitleri ile surfaktan alan ve almayan hasta gruplarına ait analiz bulguları Şekil 5.8 'de verilmiştir.



Şekil 5. 8. Surfaktan tedavisi ile birlikte hastalardaki alfa-1 antikimotripsinin düzeyinin dağılımı. Seri 1: Surfaktan tedavisi öncesi vakaların AAKT değerleri. Seri 2: Surfaktan tedavisi sonrasında 6-12. saatler arasında vakaların AAKT değerleri. Seri 3: Surfaktan tedavisinden 24 saat sonrasında vakaların AAKT değerleri (ELISA Deney Sonuçları).

ELISA deneyi sonuçlarına göre, surfaktan tedavisi sonrası, alfa-1 antikimotripsinin ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Sonuçlara göre, surfaktan uygulamasından sonra hem 6-12 saat, hem de 24 saat sonrasında, uygulama öncesine göre AAKT ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, uygulama sonrası 6-12. saat ve 24. saat sonuçları karşılaştırıldığında da gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.9).



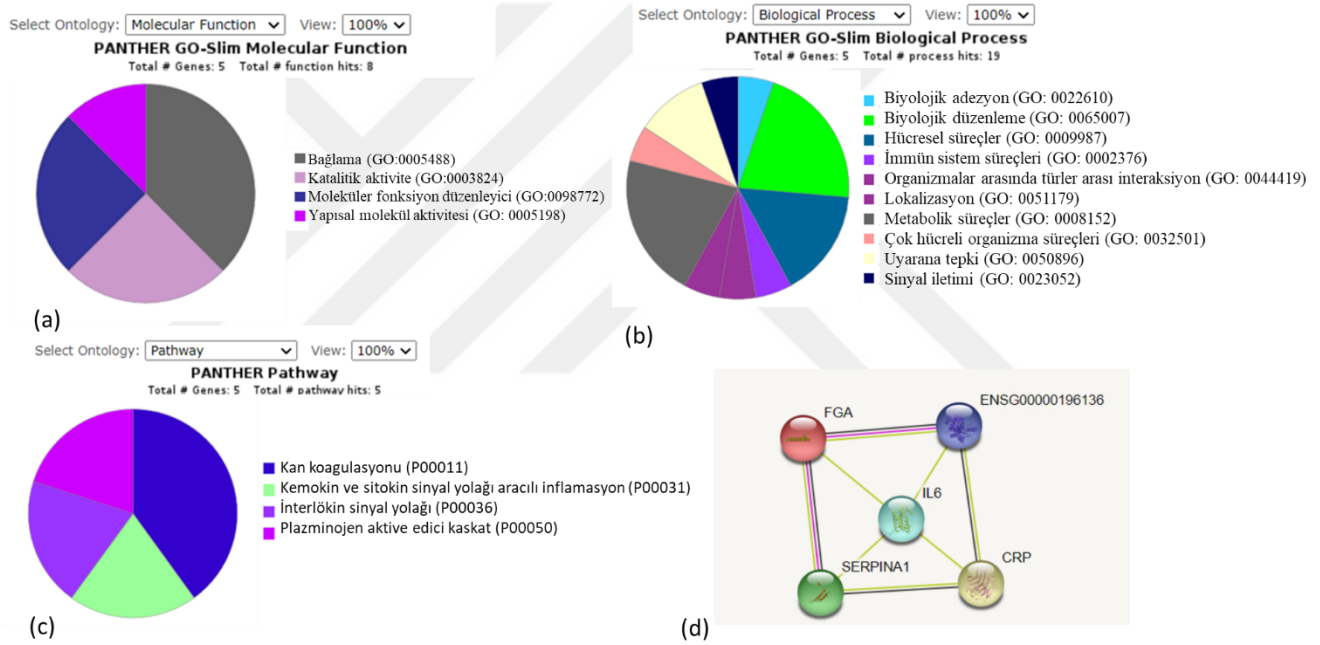
Şekil 5. 9. Alfa-1 antikimotripsinin surfaktan tedavisi ile birlikte gruplar arasındaki değişimi (Surfaktan tedavisi almayan grupta doğumdan hemen sonra alınan plazma örnekleri ile 24 saat sonrasında alınan plazma örneklerindeki AAKT düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Surfaktan tedavisi alan grupta, tedavi sonrasında 6-12 saat aralığında ve 24 saat sonrasında alfa-1 antikimotripsin düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir).

Çizelge 5. 6. Surfaktan alan vakalarda surfaktan tedavisi ile alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin plazma düzeylerinin değişimi (ELISA deneyleri)

Surfaktan Alan Hasta Grubu	Surfaktan Öncesi	Surfaktan Tedavisinden 6-12 saat sonra	P değeri	Surfaktan Öncesi	Surfaktan tedavisinin 24. Saatinden sonra	P değeri
Alfa-1 Antitripsin(gr/L)	2,60±0,33	8,66±0,75	0,000	2,60±0,33	13,24±1,45	0,000
Alfa-1 Antikimotripsin (mg/dl)	337,44±67,33	528,01±69,58	0,000	337,44±67,33	999,71±117,04	0,000
Surfaktan Alan hasta Grubu		Surfaktan Tedavisinden 6-12 saat sonra		Surfaktan tedavisinin 24. Saatinden sonra		P değeri
Alfa-1 Antitripsin(gr/L)		8,66±0,75		13,24±1,45		0,000
Alfa-1 Antikimotripsin(mg/dl)		528,01±69,58		999,71±117,04		0,000

Çizelge 5. 7. Surfaktan almayan vakalarda alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin plazma düzeylerinin değişimi (ELISA deneyleri)

Surfaktan Almayan Hasta grubu	Doğumdan Sonrası Değerleri	Postnatal 24. saatten Sonraki Değerleri	p Değeri
Alfa-1 Antitripsin(gr/L)	2,63±0,77	2,61±0,61	0,864
Alfa-1 Antikimotripsin (mg/dl)	469,20±80,11	488,70±87,19	0,022



Şekil 5. 10. Çalışmada gruplar arası ifade farklılıkları incelenen proteinlerin PANTHER ve STRING veri tabanları ile değerlendirilmesi. Western blotlama ve ELISA yöntemleri ile surfaktan alan ve almayan örnekler arasında ifade farklılıkları araştırılmış olan 5 proteine ait (Alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsin, interlökin-6, CRP, fibrinojen) PANTHER (Classification System, Version 16.0) veri tabanından alınan (a) moleküler fonksiyon, (b) biyolojik süreç, (c) yolak bilgileri ile (d) aynı proteinlere ait STRING (Version 11.5) veri tabanından alınan protein ilişki grafiği (FGA: Fibrinojen alfa, IL6: İnterlökin-6, SERPINA1: Alfa-1 antitripsin, CRP: C-reaktif protein, ENSG00000196136: Alfa-1 antikimotripsin)

Çizelge 5. 8. Çalışmada ifade farklılıkları araştırılan alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsin, interlökin-6, CRP, fibrinojen proteinlerinin STRING (Version 11.5) veri tabanına göre ilişkili olduğu yollar ve tanımları

Yolak	Tanım
HSA-8957275 (Reactome yolağı)	Translasyon sonrası protein fosforilasyonu
HSA-381426 (Reactome yolağı)	İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF) transportunun ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlantı proteinleri (IGFBPs) tarafından alımının düzenlenmesi
WP4970 (WikiPathways)	Galanin reseptör yolağı
WP4136 (WikiPathways)	Fibrin komplement reseptör 3 sinyal yolağı
WP364 (WikiPathways)	IL-6 sinyal yolağı
WP176 (WikiPathways)	Folat metabolizması
WP1533(WikiPathways)	Vitamin B12 metabolizması
WP15 (WikiPathways)	Selenyum mikronutrient ağı
WP3624(WikiPathways)	Akciğer fibrozu
WP2806 (WikiPathways)	Komplement sistem

Çalışmada surfaktan alan ve surfaktan almayan gruplar arasında ifadeleri Western Blot ve ELISA deneyleri ile belirlenen beş protein (Alfa-1 antitripsin, alfa-1 antikimotripsin, interlökin-6, CRP, fibrinojen), PANTHER (Classification System, Version 16.0) ve STRING (Version 11.5) veri tabanlarında analiz edilerek, moleküler fonksiyonları, biyolojik süreçlerdeki görevleri, yolak bilgileri ve aralarındaki protein-protein ilişkileri açısından değerlendirilmiştir (Şekil 5.10). Bu proteinlerin ilişkili oldukları yollar ise STRING (Versiyon 11.5) veri tabanı kullanılarak belirlenmiş ve Çizelge 5.8’de verilmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Son yıllardaki yeni teknolojik gelişmeler ile birlikte; daha az barotraumaya neden olan mekanik solunum yöntemlerinin kullanılması, antenatal steroid ve postnatal eksojen surfaktan tedavileri gibi gelişmeler ile artan bilgi ve deneyim, düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerin sağkalım oranları ve komplikasyonsuz yaşam kalitesini belirgin olarak artırmıştır (113, 114). Ancak RDS'nin erken ve geç komplikasyonları, prematüre bebeklerde kalıcı sekel ve ölüm nedenleri arasında önemli yere sahiptir. Bu çalışmadaki gruplar değerlendirildiğinde surfaktan tedavisi alan RDS hastalarının doğum haftasının literatür ile uyumlu olarak daha küçük olduğu görülmüştür (Çizelge 5.1). Yine diğer risk faktörleri değerlendirildiğinde C/S doğum surfaktan alan RDS grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Çizelge 5.2) (115). Literatürde, erkek cinsiyet RDS için artmış risk faktörü olarak bildirilirken (2), bu çalışmada cinsiyet açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır (Çizelge 5.2). Maternal diyabet, maternal hipotiroidi gibi maternal hastalıklar ve koryoamniyonit, perinatal asfiksi gibi perinatal risk faktörleri bulunan vakalar bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Antenatal steroid kullanımı akciğer maturasyonunu hızlandırarak, surfaktan döngüsünü sağlamakta ve RDS riskini azaltmaktadır(14). Bu çalışmada da surfaktan almayan grupta antenatal steroid kullanımı 12 vakada varken, RDS grubunda hiçbir anneye steroid tedavisi verilmemiştir (Çizelge 5.2).

RDS gelişen bebeklere eksojen surfaktan tedavisi kullanılmaktadır ve özellikle çok küçük premtürelere doğum odasında profilaktik surfaktan verilmesi önerilmektedir. Prematüre bebeklere solunum yetmezliği nedeniyle, 1960 yılından bu yana mekanik ventilatör desteği sağlanmaktadır, yine seksenlerden itibaren surfaktan tedavisi başlamış, 1989 yılında eksojen surfaktan preparatlarının FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almasıyla kullanımları hızlı artış göstermiştir(114, 116).

RDS ve BPD patofizyolojisi akciğerde gelişen enflamasyona dayanır(117, 118). RDS kliniğinde ve BPD gelişiminde proenflamatuvar sitokinler ile bunlara karşıt sitokinler arasındaki denge önemlidir(119). Bu sitokinler kapiller damarlardaki permeabilityi değiştirerek, nötrofillerde göçe neden olurlar. Böylece serbest oksijen radikalleri salınarak,

doku hasarı gelişir. Bu sürecin sonunda akciğerde fibrozis gelişir ve BPD'nin temelleri atılmış olur(120-122).

Antenatal steroid tedavisi fetal pulmoner gelişimi hızlandırmaktadır. Antenatal steroid uygulanması, surfaktan lipidlerinin üretimini, dört surfaktan proteininin salınımını, lipojenik enzim aktivasyonunu sağlayarak ve siklik adenosin monofosfat düzeyini arttırarak tip 2 pnömositlerin farklılaşmasını uyarır (77).

Dokusal hasar ve enflamasyon gelişimi sonucunda, vücudumuz bu hasarı düzeltmek için akut faz reaktanları gibi mekanizmaları devreye sokmaktadır. Sentezlenen bu proteinlerin uyarılara karşı değişimleri, sentezlenme hızları, kütsel büyüklükleri, serumdaki yoğunlukları ve katabolizmaları önemli farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışmada RDS gelişen hastalarda tekrarlayan surfaktan ihtiyacı ile IL-6, CRP, fibrinojen, alfa 1 antikomtripsin ve alfa 1 antitripsin düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi.

Vakaların enflamasyon durumu değerlendirilerken tam kan sayımı yapılmıştır. Lökosit sayısı, hemoglobin düzeyi ve trombosit sayıları arasında fark bulunmamaktadır. Mutlak hücre sayıları yerine, immatür nötrofil sayısı ile total nötrofil sayısının oranı (I/T) daha tanıda daha değerlidir. Hayatın ilk 3 günü, I/T oranı 0,20 altında olmalıdır ve bunun inflamasyon sırasında yükselmesi, inflamatuvar sürecin tanı sensitivitesini yükseltmektedir (123, 124). Bu çalışmada, yine literatüre uygun olarak, surfaktan almayan grupta I/T oranı ortalaması $0,18 \pm 0,1$ iken, surfaktan alan RDS'li grupta I/T oranı ortalaması $0,34 \pm 0,1$ tespit edilmiştir (Çizelge 5.3). Yine surfaktan almayan grupla bir, iki ve üç kez surfaktan alan hastalar karşılaştırıldığında I/T oranının RDS şiddetiyle birlikte artış gösterdiği tespit edildi. Yine doğum ağırlığından bağımsız olarak, tüm yenidoğan bebeklerin, ilk 10 günde trombosit sayısı $100000/\text{mm}^3$ 'ten yüksektir ve daha sonraki 3 hafta süresince $150000/\text{mm}^3$ 'ten yüksek olmalıdır. Trombosit sayısında düşmesi, yenidoğan sepsisinde non spesifik olarak görülebilir(125). Çalışmada her iki grupta trombosit sayısı ortalaması $200000/\text{mm}^3$ üzerinde tespit edilmiştir ve her iki vaka grubunun kan kültürlerinde üreme olmamıştır.

CRP enflamasyon başladıktan hemen sonra saatler içinde serumda yükselir. CRP'nin enflamasyon nedeniyle duplikasyon süresi ortalama 8 saat, serumdaki yarılanma süresi ise ortalama 19 saattir. CRP enflamasyonda hızlı yükselir, genellikle klinik bulgu saptandığı gün CRP de yüksek bulunur(126). Yenidoğanlardaki enflamasyonun değerlendirilmesi için en etkin parametrelerden birisidir(127). CRP plasentayı geçmemektedir veya çok az düzeyde geçebilir. Bu nedenle yenidoğanda CRP yüksekliği anneye bağlı değildir. Bebeğin prematüre oluşu CRP düzeyini etkilemez(128). Yenidoğan bebekte CRP, sadece enfeksiyon sırasında değil, aynı zamanda inflamasyona neden olan preeklampsi, hipoksi, RDS, mekonyum aspirasyonu ve intrakraniyal kanama gibi durumlarda da yükselmektedir(129). Bu çalışmada surfaktan tedavisi alan vakaların plazma CRP ortalaması $7,44 \pm 3,18$ mg/L tespit edildi. Surfactan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma CRP ortalaması $3,59 \pm 10,47$ mg/L olarak belirlendi ve anlamlı olarak daha düşük tespit edildi (Şekil 5.1). Yine yenidoğan döneminde ilk 48-72 saatte doğum eylemine bağlı olarak CRP düzeylerinde dalgalanma olabilmektedir. 8 mg/L değerini anlamlı alt sınır kabul edecek olursak surfaktan alan grupta bu değer üzerinde 2 vaka varken surfaktan almayan grupta 11 vaka vardı(Şekil 5.2). Yine istatistiksel farkın varlığı CRP değeri ile RDS' ye bağlı enflamasyon arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Yine surfaktan almayan grupla bir, iki ve üç kez surfaktan alan hastalar karşılaştırıldığında CRP değerinin RDS şiddetiyle birlikte artış gösterdiği tespit edildi (Çizelge 5.4).

Sitokinler RDS temelini oluşturan enflamasyon gelişiminde önemli yere sahiptirler(115). IL-6 enflamasyon, immünite ve hematopoez üzerinde etkili bir medyatördür. IL-6; fibroblastlar, vasküler endotelial hücreler, T lenfositler, mononükleer fagositlerden salınır. IL-6 lokal enflamasyon alanında salgılandıktan sonra kan dolaşıma ile karaciğere ulaşır ve CRP, serum amiloid A (SAA), fibrinojen, haptogloblin ve alfa 1-antikimotripsin sentezini uyarır(130). Bu nedenle de özellikle enflamasyonda CRP'den önce yükselebileceği ve daha erken tanı imkanı sağlayabileceği ileri sürülmektedir(131). IL-6 kemik iliğine ulaştığında, megakaryosit maturasyonunu uyarır. Bu nedenle laboratuvar testlerinde trombositoz olması enflamasyonun şiddeti ile doğru orantılıdır(132). Ayrıca IL-6, CD4 T hücrelerinin farklılaşmasını uyararak doğal immünitinin olgunlaşmasında görev yapar. Bu çalışmada surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma IL-6 ortalaması ($40,03 \pm 75$ pg/mL), surfaktan tedavisi alan vakaların plazma IL-6 ortalamasından ($167,45 \pm 195$ pg/mL) daha düşük tespit edildi (Şekil 5.1). 23 pg/mL değeri alt sınır kabul

edildiğinde bu değerin üzerinde surfaktan alan grupta (25 vaka) surfaktan almayan gruba (9 vaka) göre daha fazla vaka bulunmaktaydı (Şekil 5.2). Yine surfaktan almayan grupla bir, iki ve üç kez surfaktan alan hastalar karşılaştırıldığında IL-6 düzeyinin RDS şiddetiyle birlikte artış gösterdiği tespit edildi.

Fibrinin solübl prekürsörü olan fibrinojen, karaciğerde sentezlenen, plazma proteinlerinin %2'sini oluşturan, 340 kDa ağırlığında bir proteindir. Üretimi tıpkı CRP gibi IL6 tarafından kontrol edilmektedir. Fibrinojen bir akut faz reaktanıdır ve koagülasyon kaskadında rol alır. Fibrinojenin plazma yarıömrü yaklaşık 3-5 gündür(133). Fibrinojen molekülü homodimer yapısındadır ve her yarısı üç parça identik olmayan polipeptidler zincirinden (A α -, B β - ve γ -zincirleri) meydana gelir ve bu üç zinciri, dördüncü kromozomun uzun kolu üzerindeki üç gen (FGA, FGB ve FGG) kodlamaktadır. Fibrinojen'de CRP gibi inflamasyon sırasında yükselmektedir. Bu çalışmada surfaktan tedavisi almayan prematüre bebeklerin plazma fibrinojen ortalaması 141,31 $\pm$ 90,63mg/dL iken, surfaktan tedavisi alan vakaların plazma fibrinojen ortalaması 128,87 $\pm$ 63,02mg/dL tespit edildi. 150 mg/dL değerini eşik sınır kabul ettiğimiz zaman; surfaktan alan grupta fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde olan 11/30 (%36) hasta varken surfaktan almayan grupta fibrinojen değeri 150 mg/dL üzerinde olan 9/29 (%31) hasta vardı (Şekil 5.2). Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Fibrinojenin plazmadaki artışı 24 saatten sonra gözlemlenmektedir. Bu çalışmada hastaların tamamından fibrinojen örneği ilk 24 saat içinde alındığı için anlamlı bir fark görülmemektedir. Ancak bu durum bize perinatal (doğumdan önce ve doğum sırasında) bir enfeksiyon bulunmadığı konusunda destekleyici bilgi vermektedir. Annede olan koryoamniyonit ve benzeri ciddi bir enfeksiyon fibrinojen değerlerinin daha önceden yükselmesini sağlayacaktır. Yine hastaların aldığı surfaktan sayısı ile fibrinojen yüksekliği arasında bir ilişki bulunmamıştır.

İn vivo 3-NT (Nitrotirozin) oluşmasının ilk göstergesi, 1990'da Ohshima ve arkadaşlarının insan idrar örneğinde serbest nitrotirozin ve nitrotirozinin deaminlenmiş/dekarboksillenmiş metaboliti olan 3-nitro-4-hidroksifenil asetatı tespit etmesidir. 3-NT, normalde insanların plazma ve dokularında tespit edilemeyecek kadar düşükken, inflamasyon ve dejenerasyonun eşlik ettiği süreçler ve oksidatif stresin arttığı durumlarda plazmada önemli miktarda artmaktadır(24, 134). Protein oksidasyonu ve nitrasyonu insan ve hayvan deneylerinde oksidatif stresin bulgusu olarak görülmektedir. Ancak insanda nitrasyon ile

protein modifikasyonu üzerine yeterli çalışma yoktur. Akut RDS hastalarında yapılan çalışmalarda koagülasyon, proteolizis ve metal bağlama yollarında görev yapan nitrasyon modifikasyona uğrayan seruloplazmin, transferin, alfa-1 antikimotripsin, alfa-1 antitripsin ve fibrinojen proteinlerinde artış görülmektedir. Bu proteinler hemostazın sağlanmasında ve akciğerin oksidatif strese korunmasında görev yapmaktadır. Akut RDS hastalarında bu proteinlerin yükselişi belirgindir. Alfa-1 antikimotripsin akut RDS hastalarında sağlıklı bireylere göre 3-4 kat artmaktadır. Birçok çalışmada akut akciğer hasarı gelişmiş hastalarda alveoller ve kapillerde fibrin ağları birikimi ve dolayısıyla prokoagülan proteinlerde artış ve fibrinolitik aktivitede azalma görülmüştür. Akut RDS hastalarında plazma proteinlerinin aktivitesi nitrasyon ile modifiye edilerek gelişmektedir. Nitrasyon tek başına bu proteinlerdeki fonksiyonel farklılığı sağlamamaktadır, oksidasyon gibi diğer biyokimyasal yollarla etkilidir. Örneğin metionin, sistein, triptofan gibi kritik öneme sahip aminoasitleri oksidasyonu fonksiyonel farklılık yaratabilir. Yine çalışmalarda bazı proteinlerin RDS tablosunda hem nitrasyon hemde oksidasyona uğradığı gösterilmiştir(134). Yine nitrasyon sağlayan birçok faktör tirozin, sistein, metionin ve triptofan rezidülerini okside etmektedir. Proteinlerde yüzeyde yerleşen tirozin rezidüleri nitrasyona uğramaktadır. Yine farklı çalışmalarda insan plazmasındaki serbest tirozinin, nitrasyon ajanları ile nitrasyona uğradığı görülmüştür(135, 136). Plazma proteinlerinin ajanlar yardımıyla nitrasyonu sonucunda fonksiyonda inhibisyon (Alfa-1 antitripsin, seruloplazmin), fonksiyon kazanma (fibrinojen), veya etki etmediği (Alfa-1 antikimotripsin, transferrin) görülmüştür. Alfa-1 antitripsinin nitrasyonu bu proteinin elastaza karşı inhibitör fonksiyonunu inaktive etmektedir. Ancak CO₂ azaldığında Alfa-1 antitripsinin peroksinitrat ile etkileşmesi metionin rezidülerinin oksidasyonu ile elastaz aktivitesini inaktive etmektedir(137). Buna karşın elastaz aktivitesinin kaybolması ile Alfa-1 antikimotripsin aktivitesi nitrasyon ajanları ile inhibe olmaz ve RDS hastaları ile sağlıklı bireylerin plazma Alfa-1 antikimotripsin aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu nitrasyona uğrayan proteinlerin plazmadan temizlenme yarı ömrünün belirlenmesi açısından anlamlı olabilir. Plazmadan temizlenmesi kısmen yavaş olan Alfa-1 antikimotripsin yarı ömrü nitrasyona uğramış proteinlerin ortalama plazmadan temizlenme süresi hakkında bilgi verebilmektedir(138). En çok merak edilen konu fibrinojenin nitrasyon ajanları ile etkileşimi sonucunda trombin ile reaksiyona girişi ve pıhtı oluşumuna katkısıdır. Fibrinojenin oksidasyonu trombin ile etkileşim ve pıhtı

oluşumunu olumsuz etkilemektedir. Ancak bu durum fibrinojenin nitrasyonunun pıhtı oluşumu üzerine etkisini öngörememektedir. Fibrinoliziste görevli plazmojenin nitrasyonu akut RDS hastalarında gösterilememiştir. Fibrinojendeki 24 disülfid köprüsü kararlı bir yapı oluşturarak tirozin redizülerinin nitrasyonunu güçleştirmektedir. Ancak RDS hastalarındaki artan pıhtı formasyonu fibrinojenin aktivitesini etkileyen alternatif bir yolağı düşündürmektedir(139). Tüm bu bilgilerin ışığında akut RDS hastalarında artan protein nitrasyonu bu hastalığın gelişmesini ve ilerleyişini etkilemektedir. Bu proteinlerin plazmada artan düzeylerinin tespiti hastalığın şiddeti ve tekrarlayan surfaktan gereksinimi konusunda klinisyenlere bilgi verecektir. Yine AAT ve AAKT proteinlerinin fonksiyonel aktivasyonunda glikolizasyon önem arz etmektedir. Glikozilasyon proteinlerin doğru katlanmasına ve kararlı olmasına destek olur. AAT, polipeptit omurgasında üç spesifik bölgede Asn bağlantılı glikozilasyon gösterir. Bu pozisyonlardan ikisi, ekson II içinde kodlanmış Asn 46 ve Asn 83'te bulunur ve diğer pozisyon, ekson III içinde kodlanmış Asn 247'de bulunur (76).

Yapılan çalışmalar, sitokinlerin AAT glikozilasyonunun derecesini düzenlediğini göstermiştir. Örneğin, interferon gama, IL-1, IL-6 ve TNF- α AAT'deki dallı oligosakkaritlerin sayısında artışa neden olur (78, 79, 140). Yine Covid 19 hastaları ile yapılan bir çalışmada hasta serum örneklerinde yüksek miktarda AAT düzeyi tespit edilmiştir. Bu çalışmada IL-6 ve AAT artışı ile hastalık şiddeti arasında korelasyon tespit edilmiştir. Covid hastalarında diğer toplum kökenli pnömoni hastalarına göre daha yüksek IL-6 ve AAT düzeyleri tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçları AAT'nin akciğer üzerindeki anti-inflamatuvar etkinliğini kanıtlamaktadır ve ağır anfizem ile seyreden hastalarda AAT tedavisi onay almıştır (141). Yine AAT proteininin yapısal varyantlarının coğrafi dağılımının Avrupa genelinde COVID-19 epidemiyolojisi ve ciddiyetindeki farklılıklarla bir dereceye kadar bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (142). Korona ve influenza virüsleri de dahil olmak üzere çeşitli virüsler solunum sisteminin proteaz/antiproteaz dengesine duyarlıdır. Bu nedenle, spesifik olmayan AAT inaktivasyonunu önleyen stratejiler ve proteaz-antiproteaz dengesinin korunması, viral enfeksiyonların önlenmesi için hedefler olarak hizmet edebilir (142, 143). Yine yakın tarihli bir çalışma, AAT'nin C-terminal peptidinin (serbest α -karboksil grubu taşıyan amino asit kalıntısı) idiyopatik pulmoner fibrozlu hastalarda akut alevlenmeler için öngörücü bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (144).

Bu çalışmada alfa-1 antitripsin düzeyinin RDS'li hastalarda surfaktan tedavisi öncesi düşük olduğu, surfaktan tedavisi sonrası yükseldiği görülmüştür (Şekil 5.4 ve Şekil 5.7). Bu durum akut faz reaktanı olan alfa-1 antitripsinin enflamasyon sırasında yükselmesine karşın proteaz inhibitörü olmasından dolayı hızla tüketildiğini ve surfaktan tedavisi sonrasında tekrar yükselişe geçtiğini göstermektedir. Böylece enflamasyon bölgesindeki kronik hasarı önlemekte ve paramkimin zarar görmesini engellemektedir. Bu çalışmada alfa-1 antikimotripsin düzeyinde surfaktan tedavisi öncesinde azaldığı ve yine surfaktan tedavisi sonrasında arttığı gösterilmiştir (Şekil 5.9 ve Çizelge 5.6). Ancak western blot deneylerinde alfa-1 antikimotripsinin 65 kDA'luk izoformunda azalma olduğu görülmüştür (Şekil 5.5). Nükleotid dizisinden elde edilen antikimotripsinin tam amino asit dizisinde 4 pozisyonda (8,68,161,246) glikolizasyon bölgeleri bulunmaktadır (101). Yapılan bir N-glikanaz ve merkaptotanol ile deglikolize edilen antikimotripsinin 56 kDA, 52, kDA ve 48 kDA'luk üç farklı band olarak tespit edildiği gösterilmiştir (102). Bu çalışmamızda alfa-1 antikimotripsinin 65 kDA'luk izoformundaki azalma ile birlikte 48 kDA'luk izoformundaki artış, daha aktif olan glikolize formun antiproteaz aktivite sonucu tüketildiğini ve böylece deglikolize izoformun artmış olabileceğini düşündürmektedir. AAKT molekül ağırlığı 45 ile 68 kDa arasında değişmektedir, glikosile yapısı bulunan proteinin moleküler ağırlığındaki varyasyon, glikozilasyon mikroheterojenitesine atfedilmektedir (96). Yine Çin'de, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında tanı amaçlı kullanılabilecek biyobelirteç tespiti amacıyla yapılan çalışmada, AAKT'nin glikolisasyonu ile moleküler ağırlığının arttığı gösterilmiş ve biyobelirteç olarak spesifitesinin arttığı belirtilmiştir (145). AAKT akciğerde hem makrofajlar hem de alveolar epitel hücresinde üretilmektedir. Akciğerde üretilen antikimotripsinin, antiproteaz etkinliği %15 kadardır. Antiproteaz etkinliğin daha düşük oluşu karaciğerde üretilen antikimotripsine göre glikolisasyon düzeyinin daha düşük oluşuna bağlanmıştır (104). Bu durum AAKT'nin yarılama ömrünü etkilemektedir. Bronkoalveolar lavaj ile elde edilen antiproteaz örneklerinin Katepsin G gibi serin proteinazlar geniş bir özgüllüğe sahiptir ve elastin, kolajen tip III ve IV gibi yapısal elementleri parçalama yeteneğine sahiptir. Bu enzimler bakterilerin öldürülmesi için önem arz etmektedir ancak inflamasyona bağlı doku hasarını tekrar şekillendirilmesi için antiproteazlar ile bir denge içerisinde bulunmaları gerekir. Alfa-1 antitripsin; proteazlar, sitokinler, yağ asitleri, lipoproteinler, prohepsidin, surfaktan protein A ve kompleman sistemi ile bağlanabilir. Böylece antiproteaz, apoptoz

inhibisyonu, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, doku onarımı ve antioksidan aktivite gösterir (77). Diğer taraftan, 1-antikimotripsin de nötrofil proteinazı, katepsin G'yi ve mast hücre kimazlarını inhibe eder ve alt solunum yolunu proteolitik enzimlerin vereceği hasardan korur (94).

Singer ve arkadaşları 125 gebede yaptıkları çalışmada hastaların amniyotik sıvı ve kord kanlarındaki alfa-1 antitripsin düzeylerini değerlendirmişlerdir (111). Bu çalışmada 11 ve 42 gebelik haftaları arasındaki farklı gebelerden, farklı gebelik haftalarında alınan amniyotik sıvı örneklerine ve yine bebeklerinden alınan kord kanlarındaki alfa-1 antitripsin düzeylerine bakılmış, ilk iki trimesterde alfa-1 antitripsin düzeylerinin artıp sonrasında tekrar düştüğü gösterilmiştir, yine kord kanı örneklerinde de benzer bulgular tespit edilmiştir. Bu durum alfa-1 antitripsinle birlikte tüm protein miktarlarında (Surfaktan proteinleri dahil) azalmaya bağlanmış, en fazla düşüş olan bebeklerde daha şiddetli RDS gelişeceği öne sürülmüştür. Bu durum bizim çalışmamızdaki bulgular ile uyumludur. Ancak literatürde surfaktan öncesi ve sonrasını karşılaştıran başka bir çalışma bulunmamaktadır. Günümüzde riskli durumların olduğu gebeliklerde tanı amaçlı amniyosentez ya da kordosentez uygulamaları yapılmaktadır. Ancak RDS ile ilgili değerlendirme için bu girişimsel uygulamalar pratik değildir. Hastanın doğumdan sonra alfa-1 antitripsin düzeyi ile değerlendirilmesi diğer akut faz reaktanlarına ek olarak hızlı ve değerli olacaktır. Yine İspanya'dan sunulan farklı bir çalışmada RDS gelişen hastalarda alfa-1 antitripsin düzeyinin düşüşü, oluşan hiyalen membranların ortadan kaldırılması sırasındaki tüketimine bağlamıştır (146). Simon ve arkadaşlarının çalışmasında ise alfa-1 antitripsin ve diğer antienflamatuvar sitokinlerin RDS döneminde düşük kalmasının ilerleyen dönemlerde kronik akciğer hastalığına (BPD) yatkınlık sağlayacağı belirtilmiştir(126). Farklı hayvan deneylerinde ventilatör kaynaklı akciğer hasarı sonrası alfa-1 antitripsin tedavisinin akciğer hasarında anlamlı gerilemeye neden olduğu gösterilmiştir (147, 148). Mahadeva ve arkadaşları 157 kistik fibrozisli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada plazma alfa-1 antikimotripsin düzeyi düşük olan hastalarda kistik fibroze bağlı akciğer hasarının daha düşük olduğunu göstermiştir (149). Bu çalışmada kistik fibrozisli hastalarda alfa-1 antikimotripsin düzeyleri bakılmış ve 65 kDa'luk ünitenin düşük olduğu vakalarda akciğer bulgularının daha iyi seyrettiği gösterilmiştir. Bu çalışmadaki 65 kDa'luk üniteye azalma ile daha iyi akciğer prognozunun olması, bizim çalışmamızdaki surfaktan tedavisi sonrası 65 kDa'luk üniteye azalma ile benzerdir (Şekil

5.5). Ayrıca her hastanın plazma örneklerinin tek tek değerlendirildiği ELISA deneylerinde western blot deneylerinde elde edilen sonuçlara benzer olarak surfaktan tedavisi öncesinde Alfa-1 antitripsin ve Alfa-1 antikimotripsin düzeylerinin düşük olduğu surfaktan tedavisi ile plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu durum oksidatif stres ve inflamasyon durumunda hızla tüketilen antiproteinazların surfaktan tedavisi ile plazma seviyelerindeki yükselişi göstermektedir.

Bütün bu bilgilerin ışığında RDS'nin şiddeti ve prognozu erken dönemde değerlendirilip, tedavi seçenekleri belirlenebilecek ve prognoz öngörülebilecektir. Böylece prematüre bebeklerin önemli sorunu olan RDS'nin şiddetinin belirlenmesi, ilişkili komplikasyonların önlenmesi ve kronik akciğer hasarı gelişmeden önleyici tedbirlerin alınması mümkün olacaktır. Bu amaçla öncelikle antenatal koryoamniyonit riski açısından bebeğin septik taraması hızlıca tamamlanmalı ve antibiyotik tedavisi başlanmalıdır. Enfeksiyon sonucu gelişecek enflamasyonun akciğer parankimine vereceği hasar azaltılmalıdır. Yine enfeksiyon ve immatüritenin gerektireceği invaziv mekanik ventilasyon yerine hasta hızla stabilize edilerek non-invaziv ventilasyon tekniklerine geçilmelidir. Bu akciğer alveollerine karşı olan barotravma ve valutravmayı azaltacaktır. CPAP ve NIPPV gibi teknikler ilk tercih olmalıdır. Akciğer parankimini korumaya yönelik bu stratejiler oksijen kullanımını ve toksisitesini azaltacaktır. Hastanın vücut ısısının stabilize edilmesi ve ihtiyacı olan sıvı tedavisinin sağlanması klinik düzelmeyi hızlandırır. Tüm bu bilgilerin ışığında öncelikli amaç RDS gelişimini engellemek sonrasında prematüriteye bağlı gelişen RDS'nin ise en hızlı ve hasar kronikleşmeden tedavi etmek olmalıdır. RDS tedavisi ve akciğer komplikasyonlarının rehabilitasyonu yenidoğan yoğunbakım ünitesinde aylar süren yatış gereksinimi doğurabilmektedir.

6.2. SONUÇ

RDS, prematüre bebeklerin önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Erken tanı alması ve etkin tedavi edilmesi gerekmektedir. RDS tanı ve tedavisinde birçok strateji bulunmaktadır. Bu çalışmada RDS tanı yöntemlerini desteklemek ve prognozu ön görmeye yönelik alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikimotripsin düzeylerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Akut RDS tablosunda ve surfaktan tedavisi sonrası plazmadaki değerleri gösterilmiştir. RDS klinik tablosu gelişen bebeklerde surfaktan tedavisi öncesinde alfa-1 antitripsin düzeylerinin düştüğü, surfaktan tedavisi sonrasında ise yükseldiği tespit

edilmiştir. Ayrıca alfa-1 antikomotripsinin biyolojik olarak daha aktif olan glikolize izoformunun, RDS gelişen hastalarda azaldığı görülmektedir. Bu durum inflamasyon sırasında antiproteinaz aktivitesi nedeniyle alfa-1 antitripsin ve alfa-1 antikomotripsinin tüketildiğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

1. Rodriguez RJ. Management of respiratory distress syndrome: an update. *Respir Care*. 2003;48(3):279-86; discussion 86-7.
2. Rubarth LB, Quinn J. Respiratory Development and Respiratory Distress Syndrome. *Neonatal Netw*. 2015;34(4):231-8.
3. Edwards MO, Kotecha SJ, Kotecha S. Respiratory distress of the term newborn infant. *Paediatr Respir Rev*. 2013 Mar;14(1):29-36.
4. Sakonidou S, Dhaliwal J. The management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants (European Consensus Guidelines--2013 update). *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2015 Oct;100(5):257-259.
5. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Xian-Tan D, Barberi I. Respiratory distress syndrome in the newborn: role of oxidative stress. *Intensive Care Med*. 2001;27(7):1116-23.
6. Gerdes JS, Yoder MC, Douglas SD, Paul M, Harris MC, Polin RA. Tracheal lavage and plasma fibronectin: relationship to respiratory distress syndrome and development of bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr*. 1986;108(4):601-6.
7. Hayran Y, Incel Uysal P, Oktem A, Aksoy GG, Akdogan N, Yalcin B. Factors affecting adherence and patient satisfaction with treatment: a cross-sectional study of 500 patients with acne vulgaris. *J Dermatolog Treat*. 2019:1-6.
8. Kendig JW, Ryan RM, Sinkin RA, Maniscalco WM, Notter RH, Guillet R, et al. Comparison of two strategies for surfactant prophylaxis in very premature infants: a multicenter randomized trial. *Pediatrics*. 1998;101(6):1006-12.
9. Soll R, Ozek E. Prophylactic protein free synthetic surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(1):CD001079.
10. Mahoney AD, Jain L. Respiratory disorders in moderately preterm, late preterm, and early term infants. *Clin Perinatol*. 2013;40(4):665-78.
11. Ramet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M. Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet*. 2000;66(5):1569-79.
12. Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab*. 1998;64(4):217-28.
13. Speer CP, Sweet DG, Halliday HL. Surfactant therapy: past, present and future. *Early Hum Dev*. 2013;89 Suppl 1:S22-4.

14. Halliday HL. Recent clinical trials of surfactant treatment for neonates. *Biol Neonate*. 2006;89(4):323-9.
15. Lotze A, Mitchell BR, Bulas DI, Zola EM, Shalwitz RA, Gunkel JH. Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with severe respiratory failure. *Survanta in Term Infants Study Group*. *J Pediatr*. 1998;132(1):40-7.
16. Soll RF. Multiple versus single dose natural surfactant extract for severe neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(2):CD000141.
17. Pandit PB, Dunn MS, Kelly EN, Perlman M. Surfactant replacement in neonates with early chronic lung disease. *Pediatrics*. 1995;95(6):851-4.
18. Speer CP, Robertson B, Curstedt T, Halliday HL, Compagnone D, Gefeller O, et al. Randomized European multicenter trial of surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: single versus multiple doses of Curosurf. *Pediatrics*. 1992;89(1):13-20.
19. Dunn MS, Shennan AT, Possmayer F. Single- versus multiple-dose surfactant replacement therapy in neonates of 30 to 36 weeks' gestation with respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1990;86(4):564-71.
20. Figueras-Aloy J, Quero J, Carbonell-Estrany X, Ginovart G, Perez-Rodriguez J, Raspall F, et al. Early administration of the second dose of surfactant (beractant) in the treatment of severe hyaline membrane disease. *Acta Paediatr*. 2001;90(3):296-301.
21. Little S, Dean T, Bevin S, Hall M, Ashton M, Church M, et al. Role of elevated plasma soluble ICAM-1 and bronchial lavage fluid IL-8 levels as markers of chronic lung disease in premature infants. *Thorax*. 1995;50(10):1073-9.
22. Ikegami M, Kallapur S, Michna J, Jobe AH. Lung injury and surfactant metabolism after hyperventilation of premature lambs. *Pediatr Res*. 2000;47(3):398-404.
23. Kim KK, Whitin JC, Sukhova NM, Cohen HJ. Increase in extracellular glutathione peroxidase in plasma and lungs of mice exposed to hyperoxia. *Pediatr Res*. 1999;46(6):715-21.
24. Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, et al. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7659-63.
25. Dilmen U, Ozdemir R, Tatar Aksoy H, Uras N, Demirel N, Kirimi E, et al. Early regular versus late selective poractant treatment in preterm infants born between 25 and 30 gestational weeks: a prospective randomized multicenter study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27(4):411-5.
26. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al. European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2016 Update. *Neonatology*. 2017;111(2):107-25.

27. Wiingreen R, Greisen G, Ebbesen F, Petersen JP, Zachariassen G, Henriksen TB, et al. Surfactant Need by Gestation for Very Preterm Babies Initiated on Early Nasal CPAP: A Danish Observational Multicentre Study of 6,628 Infants Born 2000-2013. *Neonatology*. 2017;111(4):331-6.
28. Saugstad OD. Delivery room management of term and preterm newly born infants. *Neonatology*. 2015;107(4):365-71.
29. Eke AC, Chalaan T, Shukr G, Eleje GU, Okafor CI. A systematic review and meta-analysis of progestogen use for maintenance tocolysis after preterm labor in women with intact membranes. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;132(1):11-6.
30. Crowther CA, McKinlay CJ, Middleton P, Harding JE. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for improving neonatal health outcomes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(7):CD003935.
31. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Wyckoff MH, Aziz K, Guinsburg R, et al. Part 7: Neonatal Resuscitation: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*. 2015;132(16 Suppl 1):S204-41.
32. Tarnow-Mordi W, Morris J, Kirby A, Robledo K, Askie L, Brown R, et al. Delayed versus Immediate Cord Clamping in Preterm Infants. *N Engl J Med*. 2017;377(25):2445-55.
33. Ardell S, Pfister RH, Soll R. Animal derived surfactant extract versus protein free synthetic surfactant for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;8:CD000144.
34. Bahadue FL, Soll R. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;11:CD001456.
35. Dargaville PA, Gerber A, Johansson S, De Paoli AG, Kamlin CO, Orsini F, et al. Incidence and Outcome of CPAP Failure in Preterm Infants. *Pediatrics*. 2016;138(1).
36. Singh N, Halliday HL, Stevens TP, Suresh G, Soll R, Rojas-Reyes MX. Comparison of animal-derived surfactants for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(12):CD010249.
37. Rojas-Reyes MX, Morley CJ, Soll R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012(3):CD000510.
38. Sardesai S, Biniwale M, Wertheimer F, Garingo A, Ramanathan R. Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past, present, and future. *Pediatr Res*. 2017;81(1-2):240-8.
39. Lemyre B, Laughon M, Bose C, Davis PG. Early nasal intermittent positive pressure ventilation (NIPPV) versus early nasal continuous positive airway pressure (NCPAP) for preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;12:CD005384.

40. Taha DK, Kornhauser M, Greenspan JS, Dysart KC, Aghai ZH. High Flow Nasal Cannula Use Is Associated with Increased Morbidity and Length of Hospitalization in Extremely Low Birth Weight Infants. *J Pediatr*. 2016;173:50-5 e1.
41. Mukerji A, Dunn M. High-Frequency Ventilation as a Mode of Noninvasive Respiratory Support. *Clin Perinatol*. 2016;43(4):725-40.
42. Klingenberg C, Wheeler KI, McCallion N, Morley CJ, Davis PG. Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;10:CD003666.
43. McPherson C, Neil JJ, Tjoeng TH, Pineda R, Inder TE. A pilot randomized trial of high-dose caffeine therapy in preterm infants. *Pediatr Res*. 2015;78(2):198-204.
44. Schmidt B, Anderson PJ, Doyle LW, Dewey D, Grunau RE, Asztalos EV, et al. Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA*. 2012;307(3):275-82.
45. Li S, Guo P, Zou Q, He F, Xu F, Tan L. Efficacy and Safety of Plastic Wrap for Prevention of Hypothermia after Birth and during NICU in Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156960.
46. Harding JE, Cormack BE, Alexander T, Alsweiler JM, Bloomfield FH. Advances in nutrition of the newborn infant. *Lancet*. 2017;389(10079):1660-8.
47. Rabe H, Rojas-Anaya H. Inotropes for preterm babies during the transition period after birth: friend or foe? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2017;102(6):F547-F50.
48. Nickel RS, Josephson CD. Neonatal Transfusion Medicine: Five Major Unanswered Research Questions for the Twenty-First Century. *Clin Perinatol*. 2015;42(3):499-513.
49. McPherson C, Inder T. Perinatal and neonatal use of sedation and analgesia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017;22(5):314-20.
50. Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E. Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):739-43.
51. Tillett WS, Francis T. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med*. 1930;52(4):561-71.
52. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 1999;7(2):169-77.
53. Ramadori G, Van Damme J, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*. 1988;18(8):1259-64.

54. Du Clos TW, Mold C. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res.* 2004;30(3):261-77.
55. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin North Am.* 2004;51(4):939-59, viii-ix.
56. Bellanti JA, Kadlec JV, Escobar-Gutierrez A. Cytokines and the immune response. *Pediatr Clin North Am.* 1994;41(4):597-621.
57. De Benedetti F, Falk L, Ruscetti FW, Colburn NH, Faltynek CR, Oppenheim JJ. Synergistic inhibition of phorbol ester-induced transformation of JB6 cells by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Cancer Res.* 1991;51(4):1158-64.
58. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989;242(2):237-9.
59. de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(6):585-95.
60. Bornikova L, Peyvandi F, Allen G, Bernstein J, Manco-Johnson MJ. Fibrinogen replacement therapy for congenital fibrinogen deficiency. *J Thromb Haemost.* 2011;9(9):1687-704.
61. Weinberg AG, Rosenfeld CR, Manroe BL, Browne R. Neonatal blood cell count in health and disease. II. Values for lymphocytes, monocytes, and eosinophils. *J Pediatr.* 1985;106(3):462-6.
62. Krediet T, Gerards L, Fleer A, van Stekelenburg G. The predictive value of CRP and I/T-ratio in neonatal infection. *J Perinat Med.* 1992;20(6):479-85.
63. Otsubo Y, Hashimoto K, Kanbe T, Sumi M, Moriuchi H. Association of cord blood chemokines and other biomarkers with neonatal complications following intrauterine inflammation. *PLoS One.* 2017;12(5):e0175082.
64. Kalsheker NA. Alpha 1-antichymotrypsin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(9):961-4.
65. Primhak RA, Tanner MS. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Arch Dis Child.* 2001;85(1):2-5.
66. Massi G, Chiarelli C. Alpha 1-antitrypsin: molecular structure and the Pi system. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;393:1-4.
67. Hazari YM, Bashir A, Habib M, Bashir S, Habib H, Qasim MA, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;773:14-25.

68. Kolarich D, Weber A, Turecek PL, Schwarz HP, Altmann F. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics*. 2006;6(11):3369-80.
69. Silva D, Oliveira MJ, Guimaraes M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med*. 2016;116:8-18.
70. Yamasaki M, Sendall TJ, Harris LE, Lewis GM, Huntington JA. Loop-sheet mechanism of serpin polymerization tested by reactive center loop mutations. *J Biol Chem*. 2010;285(40):30752-8.
71. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 2000;407(6806):923-6.
72. Stratikos E, Gettins PG. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):4808-13.
73. Tew DJ, Bottomley SP. Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition. *FEBS Lett*. 2001;494(1-2):30-3.
74. Prus G, Hoegl A, Weinert BT, Choudhary C. Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry. *Trends Biochem Sci*. 2019;44(11):943-60.
75. Sroka-Bartnicka A, Karlsson I, Ndreu L, Quaranta A, Pijnappel M, Thorsen G. Particle-based N-linked glycan analysis of selected proteins from biological samples using nonglycosylated binders. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;132:125-32.
76. Blanchard V, Liu X, Eigel S, Kaup M, Rieck S, Janciauskiene S, et al. N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line. *Biotechnol Bioeng*. 2011;108(9):2118-28.
77. Janciauskiene S, Welte T. Well-Known and Less Well-Known Functions of Alpha-1 Antitrypsin. Its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Other Disease Developments. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 Suppl 4:S280-8.
78. Lilkova E, Petkov P, Ilieva N, Krachmarova E, Nacheva G, Litov L. Molecular modeling of the effects of glycosylation on the structure and dynamics of human interferon-gamma. *J Mol Model*. 2019;25(5):127.
79. Stelzl T, Geillinger-Kastle KE, Stolz J, Daniel H. Glycans in the intestinal peptide transporter PEPT1 contribute to function and protect from proteolysis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(6):G580-G91.
80. Hazari YM, Bashir A, Habib M, Bashir S, Habib H, Qasim MA, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutat Res*. 2017;773:14-25.

81. Ekeowa UI, Freeke J, Miranda E, Gooptu B, Bush MF, Perez J, et al. Defining the mechanism of polymerization in the serpinopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(40):17146-51.
82. Miranda E, Ferrarotti I, Berardelli R, Laffranchi M, Cerea M, Gangemi F, et al. The pathological Trento variant of alpha-1-antitrypsin (E75V) shows nonclassical behaviour during polymerization. *FEBS J*. 2017;284(13):2110-26.
83. Yamasaki M, Sendall TJ, Pearce MC, Whisstock JC, Huntington JA. Molecular basis of alpha1-antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer. *EMBO Rep*. 2011;12(10):1011-7.
84. Hutchison DC. Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med*. 1998;92(3):367-77.
85. Marcus N, Teckman JH, Perlmutter DH. Alpha1-antitrypsin deficiency: from genotype to childhood disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;27(1):65-74.
86. Blank CA, Brantly M. Clinical features and molecular characteristics of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Ann Allergy*. 1994;72(2):105-20; quiz 20-2.
87. Lindhorst A, Bechmann I, Gericke M. Unspecific DNA recombination in AdipoqCre-ER(T2) - mediated knockout approaches in transgenic mice is sex-, age- and genotype-dependent. *Adipocyte*. 2020;9(1):1-6.
88. Ioachimescu OC, Stoller JK. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2005;2(2):263-75.
89. de Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in southern Europe: France, Italy, Portugal and Spain. *Clin Genet*. 2003;63(6):490-509.
90. Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: biochemistry and clinical manifestations. *Ann Med*. 1996;28(5):385-94.
91. Molfino NA. Genetics of COPD. *Chest*. 2004;125(5):1929-40.
92. Smolonska J, Wijmenga C, Postma DS, Boezen HM. Meta-analyses on suspected chronic obstructive pulmonary disease genes: a summary of 20 years' research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(7):618-31.
93. Molfino NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13(2):107-13.
94. Rubin H, Wang ZM, Nickbarg EB, McLarney S, Naidoo N, Schoenberger OL, et al. Cloning, expression, purification, and biological activity of recombinant native and variant human alpha 1-antichymotrypsins. *J Biol Chem*. 1990;265(2):1199-207.

95. Cichy J, Potempa J, Chawla RK, Travis J. Stimulatory effect of inflammatory cytokines on alpha 1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95(6):2729-33.
96. York WS, Mazumder R, Ranzinger R, Edwards N, Kahsay R, Aoki-Kinoshita KF, et al. GlyGen: Computational and Informatics Resources for Glycoscience. *Glycobiology.* 2020;30(2):72-3.
97. Sun S, Hu Y, Jia L, Eshghi ST, Liu Y, Shah P, et al. Site-Specific Profiling of Serum Glycoproteins Using N-Linked Glycan and Glycosite Analysis Revealing Atypical N-Glycosylation Sites on Albumin and alpha-1B-Glycoprotein. *Anal Chem.* 2018;90(10):6292-9.
98. Villoutreix BO, Lilja H, Pettersson K, Lovgren T, Teleman O. Structural investigation of the alpha-1-antichymotrypsin: prostate-specific antigen complex by comparative model building. *Protein Sci.* 1996;5(5):836-51.
99. Baumann U, Huber R, Bode W, Grosse D, Lesjak M, Laurell CB. Crystal structure of cleaved human alpha 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J Mol Biol.* 1991;218(3):595-606.
100. Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: allelic association and a unique haplotype associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet.* 1994;55(1):126-33.
101. Chandra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Robson KJ, Woo SL. Sequence homology between human alpha 1-antichymotrypsin, alpha 1-antitrypsin, and antithrombin III. *Biochemistry.* 1983;22(22):5055-61.
102. Laine A, Hachulla E, Strecker G, Michalski JC, Wieruszeski JM. Structure determination of the glycans of human-serum alpha 1-antichymotrypsin using 1H-NMR spectroscopy and deglycosylation by N-glycanase. *Eur J Biochem.* 1991;197(1):209-15.
103. Bardor M, Faveeuw C, Fitchette AC, Gilbert D, Galas L, Trottein F, et al. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology.* 2003;13(6):427-34.
104. Berman G, Afford SC, Burnett D, Stockley RA. alpha 1-Antichymotrypsin in lung secretions is not an effective proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 1986;261(30):14095-9.
105. Dyck RF, Bingham W, Tan L, Rogers SL. Serum levels of C-reactive protein in neonatal respiratory distress syndrome. *Clin Pediatr (Phila).* 1984;23(7):381-3.
106. Ochi F, Higaki T, Ohta M, Yamauchi T, Tezuka M, Chisaka T, et al. Procalcitonin as a marker of respiratory disorder in neonates. *Pediatr Int.* 2015;57(2):263-8.
107. Brus F, van Oeveren W, Okken A, Bambang SO. Activation of circulating polymorphonuclear leukocytes in preterm infants with severe idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediatr Res.* 1996;39(3):456-63.

108. Kallman J, Ekholm L, Eriksson M, Malmstrom B, Schollin J. Contribution of interleukin-6 in distinguishing between mild respiratory disease and neonatal sepsis in the newborn infant. *Acta Paediatr.* 1999;88(8):880-4.
109. Vasilcan G, Avasiloaiei A, Moscalu M, Dimitriu AG, Stamatin M. [Procalcitonine-early marker of neonatal infection]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2011;115(4):1243-50.
110. Piantelli M, Pozzuoli R, Auconi P, Musiani P. Alpha-1-antitrypsin in umbilical cord serum: pi phenotypes and relationships with idiopathic respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr.* 1978;127(2):101-9.
111. Singer AD, Thibeault DW, Hobel CJ, Heiner DC. Alpha1-antitrypsin in amniotic fluid and cord blood of preterm infants with the respiratory distress syndrome. *J Pediatr.* 1976;88(1):87-93.
112. Sveger T, Ohlsson K, Polberger S, Noack G, Morse H, Laurin S. Tracheobronchial aspirate fluid neutrophil lipocalin, elastase- and neutrophil protease-4-alpha1-antitrypsin complexes, protease inhibitors and free proteolytic activity in respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr.* 2002;91(9):934-7.
113. Donn SM, Sinha SK. Newer techniques of mechanical ventilation: an overview. *Semin Neonatol.* 2002;7(5):401-7.
114. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants - 2010 update. *Neonatology.* 2010;97(4):402-17.
115. Al-Shaer OS, Behiry EG, Elsadek AE, Salama SA. Association between interleukin-10 genetic variant (-1082G>A) with detection and severity of respiratory distress syndrome in preterm neonates. *Int J Immunogenet.* 2020;47(1):50-6.
116. Gupta S, Donn SM. Novel approaches to surfactant administration. *Crit Care Res Pract.* 2012;2012:278483.
117. Sim WH, Ng H, Sheehan P. Maternal and neonatal outcomes following expectant management of preterm prelabor rupture of membranes before viability. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(4):533-41.
118. Greenberg JM, Poindexter BB, Shaw PA, Bellamy SL, Keller RL, Moore PE, et al. Respiratory medication use in extremely premature (<29 weeks) infants during initial NICU hospitalization: Results from the prematurity and respiratory outcomes program. *Pediatr Pulmonol.* 2020;55(2):360-8.
119. Perez M, Robbins ME, Revhaug C, Saugstad OD. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radic Biol Med.* 2019;142:61-72.
120. Speer CP. Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease. *Eur J Pediatr.* 1999;158 Suppl 1:S18-22.

121. Standiford TJ, Huffnagle GB. Cytokines in host defense against pneumonia. *J Investig Med*. 1997;45(6):335-45.
122. Ghezzi F, Gomez R, Romero R, Yoon BH, Edwin SS, David C, et al. Elevated interleukin-8 concentrations in amniotic fluid of mothers whose neonates subsequently develop bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998;78(1):5-10.
123. Schelonka RL, Yoder BA, desJardins SE, Hall RB, Butler J. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr*. 1994;125(4):603-6.
124. Mouzinho A, Rosenfeld CR, Sanchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics*. 1994;94(1):76-82.
125. Fustolo-Gunnink SF, Huisman EJ, van der Bom JG, van Hout FMA, Makineli S, Lopriore E, et al. Are thrombocytopenia and platelet transfusions associated with major bleeding in preterm neonates? A systematic review. *Blood Rev*. 2019;36:1-9.
126. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):206-17.
127. He YY, Chen F, Zhang Y, Xiang LL, Liu YX, Hua ZY. [C-reactive protein-guided antibiotic treatment strategy for neonates with suspected early-onset sepsis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2020;22(1):12-6.
128. Liu Y, Zhao L, Wu Z. Accuracy of C-Reactive Protein Test for Neonatal Septicemia: A Diagnostic Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2019;25:4076-81.
129. Mjelle AB, Guthe HJT, Reigstad H, Bjorke-Monsen AL, Markestad T. Serum concentrations of C-reactive protein in healthy term-born Norwegian infants 48-72 hours after birth. *Acta Paediatr*. 2019;108(5):849-54.
130. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990;11(12):443-9.
131. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 1999;88(6):647-50.
132. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*. 1989;74(4):1241-4.
133. Green F, Humphries S. Control of plasma fibrinogen levels. *Baillieres Clin Haematol*. 1989;2(4):945-59.
134. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketali LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1986;1(8471):11-4.

135. Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, et al. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(5):1428-33.
136. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci*. 1998;18(3):923-31.
137. Feste A, Gan JC. Selective loss of elastase inhibitory activity of alpha 1-proteinase inhibitor upon chemical modification of its tyrosyl residues. *J Biol Chem*. 1981;256(12):6374-80.
138. Gow A, Duran D, Thom SR, Ischiropoulos H. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333(1):42-8.
139. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *J Lab Clin Med*. 1994;124(2):263-73.
140. Mackiewicz A, Laciak M, Gorny A, Baumann H. Leukemia inhibitory factor, interferon gamma and dexamethasone regulate N-glycosylation of alpha 1-protease inhibitor in human hepatoma cells. *Eur J Cell Biol*. 1993;60(2):331-6.
141. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(6):812-21.
142. Shapira G, Shomron N, Gurwitz D. Ethnic differences in alpha-1 antitrypsin deficiency allele frequencies may partially explain national differences in COVID-19 fatality rates. *FASEB J*. 2020;34(11):14160-5.
143. Meyer M, Jaspers I. Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(12):L1189-201.
144. Carleo A, Landi C, Prasse A, Bergantini L, D'Alessandro M, Cameli P, et al. Proteomic characterization of idiopathic pulmonary fibrosis patients: stable versus acute exacerbation. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2020;90(2).
145. Jin Y, Wang J, Ye X, Su Y, Yu G, Yang Q, et al. Identification of GlcNAcylated alpha-1-antichymotrypsin as an early biomarker in human non-small-cell lung cancer by quantitative proteomic analysis with two lectins. *Br J Cancer*. 2016;114(5):532-44.
146. Jasso-Gutierrez L, Contreras G, Puente-Banuelos E, Dominguez C, Romero G. Inhibitory activity of alpha 1-antitrypsin in infants with idiopathic respiratory distress syndrome. *Arch Invest Med (Mex)*. 1979;10(1):1-6.

147. Zhu H, He J, Liu J, Zhang X, Yang F, Liu P, et al. Alpha 1-antitrypsin ameliorates ventilator-induced lung injury in rats by inhibiting inflammatory responses and apoptosis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018;243(1):87-95.
148. Wang X, Gong J, Zhu J, Jin Z, Gao W. Alpha 1-antitrypsin for treating ventilator-associated lung injury in acute respiratory distress syndrome rats. *Exp Lung Res*. 2019;45(7):209-19.
149. Mahadeva R, Sharples L, Ross-Russell RI, Webb AK, Bilton D, Lomas DA. Association of alpha(1)-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2001;56(1):53-8.



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

- 1) 28. Ulusal Neonatoloji Kongresi (Online), 10-14 Aralık 2020. Klinik Sözlü Bildiri. Ahmet Öktem, Beycan Ayhan, F. Duygu Özel Demiralp, Ayşegül Zenciroğlu, Aslıhan Alhan. 'RESPİRATUVAR DİSTRES SENDROMU TANISI ALAN PREMATÜRE BEBEKLERİN KAN PLAZMA ÖRNEKLERİNDE CRP, IL6, FİBRİNOJEN, ALFA 1 KİMOTRİPSİN VE ALFA 1 ANTİPROTEİNAZ DÜZEYLERİNİN RDS ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİ'





28. Ulusal Neonatoloji Kongresi

10 - 14 ARALIK 2020

(UNEKO 28)

BİLDİRİ ÖZETLERİ



KLİNİK SÖZLÜ BİLDİRİLER

SKB 9 RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU TANISI ALAN PREMATÜRE BEBEKLERİN KAN PLAZMA ÖRNEKLERİNDE CRP, IL6, FİBRİNOJEN, ALFA 1 KİMOTRİPSİN VE ALFA 1 ANTİPROTEİNAZ DÜZEYLERİNİN RDS ŞİDDETİ İLE İLİŞKİSİ

AHMET ÖKTEM¹, F. DUYGU ÖZEL DEMİRALP², BEYCAN AYHAN², AYŞEGÜL ZENCİROĞLU¹, ASLIHAN ALHAN³

¹ DR. SAMİ ULUS KADIN DOĞUM, ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI HASTANESİ, ANKARA

² ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, ANKARA

³ UFLUK ÜNİVERSİTESİ BİYOSTATİSTİK ANABİLİM DALI, ANKARA

Amaç:

Genellikle pretermelerde görülen Respiratuvar distres sendromu(RDS) sürfaktan eksikliğine bağlı gelişir. Son yıllarda RDS'de immatür akciğerlerde inflamatuvar zedelenmeyi izleyen kompleks ve multifaktöriyal patogenezin olabileceği şeklinde bir hipotez öne sürülmüştür. Sürfaktan eksikliği ile birlikte ortaya çıkan enflamatuvar yanıt sendromunun patolojik bulguların gelişmesinde rol alabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada bilinen (IL6, CRP ve Fibrinojen) ve yeni (Alfa 1 kimotripsin ve Alfa 1 antiproteinaz[antitripsin]) bazı enflamatuvar belirteçlerin hastalık ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem:

Çalışmaya toplam 60 prematüre bebek dahil edilmiştir. RDS olan 30 prematüre bebekten tedavi öncesi, tedaviden 6 saat sonrasında ve 24 saat sonrasında üç plazma örneği (CRP, IL-6, Fibrinojen, alfa1 antitripsin, alfa1 antikimotripsin çalışmak amacıyla) alınmıştır. RDS olmayan 30 bebekten doğum sonrasında ve 6-12 saat arasında birer kez olmak üzere iki plazma örneği çalışılmıştır. Alfa 1 antitripsin ve alfa1 antikimotripsin düzeyleri biyoteknoloji laboratuvarında western blot deneyleri ile çalışılmıştır.

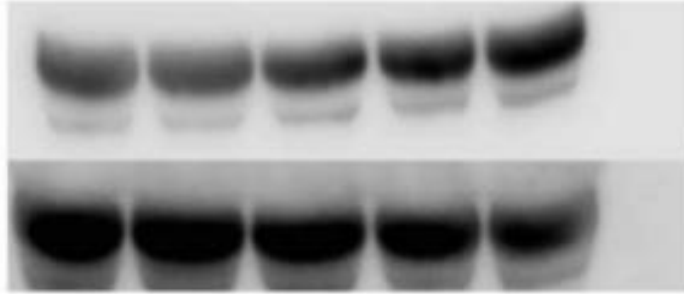
Bulgular:

Sürfaktan tedavisi öncesinde CRP, IL-6 düzeylerinin anlamlı yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Alfa 1 antitripsin düzeyinin sürfaktan tedavisine yanıt olarak yükseldiği gösterilirken, alfa1 antikimotripsinin 48 kDa'luk subünitesinde artış, 65 kDa'luk subünitesinde azalma tespit edilmiştir.

Resim 1. Alfa 1 antitripsin düzeyinin sürfaktan tedavisine yanıt olarak yükseldiği tespit edildi.

Alfa-1
Antitripsin

Beta Aktin





Resim2. Surfaktan tedavisi sonrasında alfa 1 antitripsin 48 kDA'luk subünitesinde artış, 65 kDA'luk subünitesinde azalma tespit edilmiştir.

Sonuç:

Bu çalışma ile literatürde ilk kez, alfa 1 antitripsin ve alfa 1 antikimotripsinin RDS'de surfaktan öncesi ve sonrasındaki değişimi proteom deneyleri ile gösterilmiş ve analizleri yapılmıştır. RDS şiddetinin belirlenmesi, tedavi planı ve prognozun öngörülmesinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alfa 1 antitripsin, Alfa 1 antikimotripsinin, RDS, Western Blot