



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BRONKOPULMONER DİSPLAZİ HASTALARINDA
ÇEŞİTLİ ADİPOZİTOKİN DÜZEYLERİ VE
İNFLAMATUAR MİKROÇEVRE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Berna HOTİ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr.Filiz BAKAR ATEŞ**

**ANKARA
(2020)**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BRONKOPULMONER DİSPLAZİ HASTALARINDA
ÇEŞİTLİ ADİPOZİTOKİN DÜZEYLERİ VE
İNFLAMATUAR MİKROÇEVRE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Berna HOTİ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr.Filiz BAKAR ATEŞ**

Bu araştırma Tübitak'ın 219S031 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
(2020)**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bronkopulmoner Displazi Hastalarında Çeşitli Adipositokin Düzeyleri ve Enflamatuvar Mikroçevre İlişkisinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Berna HOTİ

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalında BERNA HOTİ tarafından hazırlanan
“Bronkopulmoner Displazi Hastalarında Çeşitli Adipositokin Düzeyleri ve
İnflamatur Mikroçervree İlişkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri
tarafından DOKTOR TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret
edilmiştir.

Tez savunma tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	7
1.1.1.Akciğerlerin Yapısı ve Gelişimi	9
1.1.1.1.Embriyonik Evre	11
1.1.1.2.Psödoglandüler Evre	11
1.1.1.3.Kanaliküler Evre	12
1.1.1.4.Sakküler Evre	12
1.1.1.5.Alveoler Evre	12
1.2. Bronkopulmoner Displazi	13
1.2.1.Tanım	13
1.2.1.1.Klasik Bronkopulmoner Displazi	14
1.2.2. Etiyolojisi	17
1.2.2.1. BPD Etiyolojisinde Risk Faktörleri	17
1.2.3. İnsidansı	20
1.3. Patolojisi	21
1.4. BPD’de Koruma ve Tedavi Yaklaşımları	22
1.4.1. Oksijen Tedavisi	22
1.4.2. Sürfaktan Tedavisi	23
1.4.3. Metilksantinler	23
1.4.4. Steroidler	23
1.4.5. Vitamin A	24
1.4.6. İn hale Nitrik Oksit	24
1.4.7. Diüretikler	25
1.4.8. Bronkodilatörler	25
1.4.9. Makrolid Grubu Antibiyotikler	26
1.4.10. Yeni Tedaviler	26
1.4.10.1. İnositol	26
1.4.10.2.Clara Hücre Proteini (rHCC10)	26
1.4.10.3. Kök Hücre Tedavisi	27
1.5. Bronkopulmoner Displazi ve Pulmoner İnflamasyon	27
1.6. Pulmoner İnflamasyonu Tetikleyen Faktörler	31
1.6.1. Mekanik Ventilasyon	31
1.6.2. Hiperoksi	32
1.6.3. Koriyoamniyonitis	32
1.6.4. Enfeksiyon	33
1.7. Sitokinler	33

1.7.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)	34
1.7.2. İnterlökin-4 (IL-4)	34
1.7.3. İnterlökin-6 (IL-6)	35
1.7.4. İnterlökin-8 (IL-8)	35
1.7.5. İnterlökin-10 (IL-10)	36
1.7.6. Nükleer Faktör Kappa B (Nf-κB)	37
1.7.7. Proinflamatuvar Sitokin Yanıtı	37
1.7.8. Matriks Metalloproteinazlar	39
1.8. Yeni Adipositokinlerin ve Diğer Proinflamatuvar Sitokinlerin Bronkopulmoner Displazi Üzerindeki İnflamatuvar Etkileri	40
1.8.1. Nesfatin-1	41
1.8.1.1. Genetik Yapısı	42
1.8.1.2. Nesfatin-1 (NUCB2) Sinyal İletimi	45
1.8.1.3 Nesfatin-1'in Fizyolojik Etkileri	45
1.8.1.3.1 Gıda Alımının Düzenlenmesinde Etkileri	45
1.8.1.3.2. Gastrointestinal Fonksiyonlar Üzerindeki Etkileri	46
1.8.1.3.3. Glukoz Homeostazındaki Etkileri	46
1.8.1.3.4. Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri	47
1.8.1.3.5. Endokrin Sistem Üzerine Etkileri	47
1.8.1.3.6. Anksiyete ve Depresyon Üzerine Etkileri	48
1.8.1.3.7. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri	48
1.8.1.3.8. İmmün Sistem Üzerine Etkileri	48
1.8.1.3.9. Epilepsi Üzerine Etkileri	49
1.8.1.3.10. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	49
1.8.1.3.11. Nesfatin-1'in Sinir Sistemi Üzerine Olan Etkileri	50
1.8.1.3.12. Nesfatin-1'in Pulmoner İnflamasyon Üzerine Olan Etkileri	51
1.9. Visfatin	55
1.9.1. Tanımı	55
1.9.2. Morfolojik ve Genetik Yapısı	56
1.9.3. Sentezi	59
1.9.4. Potansiyel Fonksiyonları	60
1.9.4.1. Visfatin'in Metabolizma Üzerindeki Etkileri	60
1.9.4.2. Visfatin'in İmmünomodülatör Fonksiyonları	61
1.9.4.3. Visfatin'in Renal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi	62
1.9.4.4. Visfatin'in Vasküler Fonksiyonlar Üzerine Etkisi	63
1.9.4.5. Visfatin'in Endotel Fonksiyonlar Üzerine Etkisi	63
1.9.4.6. Visfatin'in Kardiyak Fonksiyonlar Üzerine Etkisi	64
1.9.4.7. Visfatin/PBEF/Nampt'in İskemik İnme Üzerine Etkileri	64
1.9.4.8. Visfatin'in Kanser Üzerine Etkisi	64
1.9.4.9. Visfatin'in Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi	65
1.9.4.10. Visfatin ve Egzersiz	65
2. GEREÇ ve YÖNTEM	67
2.1. Kullanılan Cihazlar	68
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	69
2.3. İstatistiksel analiz	69
2.4. Deney Planı	70

2.4.1. İnsan Kanından RNA İzolasyon Protokolü	70
2.4.2. İnsan Plazmasında Visfatin Düzeyi Tayini	72
2.4.3. İnsan Plazmasında Nesfatin-1 Düzeyi Tayini	76
2.4.4. İnsan Plazmasında IL-4 Düzeyi Tayini	80
2.4.5. İnsan Plazmasında IL-10 Düzeyi Tayini	84
2.4.6. İnsan Plazmasında Nf- κ B Düzeyi Tayini	88
2.4.7. İnsan Plazmasında MMP-9 Düzeyi Tayini	92
2.4.8. cDNA Sentezi	97
2.4.9. RT-PCR Analizi	99
3. BULGULAR	101
4.TARTIŞMA	113
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	119
ÖZET	120
SUMMARY	121
KAYNAKLAR	122
EKLER	145
EK-1: Klinik Araştırma Etik Kurul Raporu	145
ÖZGEÇMİŞ	147

ÖNSÖZ

Bu araştırma dönemi içerisinde; pek çok ilham verici ve yetenekli insanlarla işbirliği yapma ve onlardan çok şey öğrenme fırsatını yakaladım. Günlük klinik hayatı yaşamak, çocuklarla ve ebeveynleriyle tanışmak, beklediğimden çok daha eğlenceli ve heyecan verici oldu. Bu tecrübelerin bana verilen bir armağan olduğunu belirtmek isterim. Bu doğrultuda, çalışmalarına katılan tüm çocuklara ve ebeveynlere minnettarım. Onların katılımı ve sabrı olmasaydı, bu çalışma gerçekleştirilemezdi.

Araştırmam boyunca, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, koşulsuz destek, teşvikleriyle çalışmamı perçinleyen saygıdeğer doktora tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Filiz Bakar Ateş'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bana polikliniklerini açan ve çalışmalarına yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. F.Nazan Çobanoğlu ve Dr.Gizem Özcan'a, Sosyal Pediatri Bilim Dalından Sayın Doç.Dr.Seda Topçu'ya ve poliklinik hemşire ve diğer sağlık çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim dönemim boyunca gösterdikleri sevgi ve destekleri için dostlarıma teşekkür ediyorum.

Vazgeçilmezlerime...yaşamımın her anında bana duydukları güven için; annem Suzan, ablam Linda ve yeğenim Stina'ya...onlarsız kesinlikle imkânsız olurdu.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ASP	Aspartik Asid Aminoasit
BAL	Bronkoalveoler Lavaj Sıvısı
BPD	Bronkopulmoner Displazi
CCSP	Clara Hücre Sekretuar Protein
cDNA	Komplementer Deoksiribonukleik Asit
I.C.V	İntraserebroventriküler
IFN- β	İnterferon beta
IFN- γ	İnterferon Gamma
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-1	İnterlökin-1
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-13	İnterlökin-13
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-2	İnterlökin-2
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IL-7	İnterlökin-7
IL-8	İnterlökin-8
LTB ₄	Lökotrien B ₄
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAMPT	Nikotinamid Fosforibozil-Transferaz
Nf- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NICHD	Eunice Kennedy Shriver Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsani Gelişme Enstitüsü
NMN	Nikotinamid Mononükleotid
NUCB2	Nukleobindin 2
PBEF	Pre-B-Hücre Koloni-Artırıcı Faktör
RBP	Retinol-Binding Protein

RDS	Respiratuvar Distres Sendromu
TBAF	Trakeobronşiyoler Aspirat Sıvısı
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Akciğerlerin normal gelişim evreleri	11
Şekil 1.2.	Klasik ve yeni BPD hava yolu ve parankimal hasarı	22
Şekil 1.3.	Pulmoner inflamatuvar yanıtın prematüre akciğer üzerindeki etkisi	39
Şekil 1.4.	NUCB2 proteininin primer yapısı ve Nesfatin-1 molekülünün şematik gösterimi.	43
Şekil 1.5.	İnsan NUCB2 geninin şematik gösterimi	44
Şekil 1.6.	Beynin farklı bölgelerinde Nesfatin-1'in etkileri.	54
Şekil 1.7.	Visfatin/PBEF/Nampt'ın Yapısı	57
Şekil 1.8.	İnsan PBEF geninin genomik yapısı ve düzenleyici elemanlar	58
Şekil 2.1	Visfatin için Standart solüsyonlarının hazırlanması	74
Şekil 2.2.	Visfatin için kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 2.3.	Nesfatin-1 için standart solüsyonlarının hazırlanması	78
Şekil 2.4.	Nesfatin-1 kalibrasyon eğrisi	80
Şekil 2.5.	IL-4 için standart solüsyonlarının hazırlanması	81
Şekil 2.6.	IL-4 için kalibrasyon eğrisi	84
Şekil 2.7.	IL-10 için standart solüsyonlarının hazırlanması	86
Şekil 2.8.	IL-10 için kalibrasyon eğrisi	88
Şekil 2.9.	NF-κB için standart solüsyonlarının hazırlanması	89
Şekil 2.10.	NF-κB için kalibrasyon eğrisi	92
Şekil 2.11.	MMP-9 için standart solüsyonlarının hazırlanması	94
Şekil 2.12.	MMP-9 için kalibrasyon eğrisi	96
Şekil 3.1.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Visfatin düzeyleri (ng/mL)	102
Şekil 3.2.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Nesfatin-1 düzeyleri (ng/mL)	103
Şekil 3.3.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma IL-4 düzeyleri (pg/mL)	104
Şekil 3.4.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma IL-10 düzeyleri (pg/mL)	105

Şekil 3.5.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma MMP-9 düzeyleri (ng/mL)	106
Şekil 3.6.	BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Nf-κB düzeyleri (ng/mL)	107
Şekil 3.7.	BPD grubuna ait Visfatin ve MMP-9 düzeyi korelasyon eğrisi.	108
Şekil 3.8.	BPD grubuna ait Visfatin ve Nf- κB düzeyi korelasyon eğrisi.	109
Şekil 3.9.	Kontrol grubuna ait visfatin amplifikasyon eğrisi.	110
Şekil 3.10.	BPD grubuna ait visfatin amplifikasyon eğrisi.	110
Şekil 3.11.	Konrtol grubuna ait Nesfatin-1 amplifikasyon eğrisi.	110
Şekil 3.12.	BPD grubuna ait Nesfatin-1 amplifikasyon eğrisi.	111
Şekil 3.13.	Kontrol grubuna ait MMP-9 amplifikasyon eğrisi.	111
Şekil 3.14.	BPD grubuna ait MMP-9 amplifikasyon eğrisi.	111
Şekil 3.15.	Kontrol grubuna ait β-actin amplifikasyon eğrisi.	112
Şekil 3.16.	BPD grubuna ait β-actin amplifikasyon eğrisi.	112

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Akciğerlerin gelişim aşamaları	10
Çizelge 1.2	Bronkopulmopner displazi sınıflandırılması..	16
Çizelge 1.3.	Sitokinlerin etkilerine göre sınıflandırılması	38
Çizelge 1.4	Nesfatin-1'in santral ve periferel etkileri.	52
Çizelge 1.5.	Çeşitli tıbbi durumlar ve visfatin arasındaki ilişki	66
Çizelge. 3.1.	BPD ve kontrol grubuna ait demografik veriler.	101
Çizelge 3.2.	BPD ve kontrol grubu plazma Visfatin, Nesfatin-1, IL-4, IL-10, MMP-9 ve Nf-κB düzeyleri	108
Çizelge 3.3.	Visfatin, Nesfatin-1 ve MMP-9 genlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	112

1.GİRİŞ

Bronkopulmoner displazi (BPD), yeni doğanın gelişmekte olan olgunlaşmamış akciğerlerinde, akciğer hasarı ile akciğer onarımı arasındaki dengesizlikten kaynaklanan, prematüre bebeklerde görülen kronik bir akciğer hastalığıdır (Jobe, 2015).

Hastalığın etiyolojisi multifaktöriyel olmakla birlikte, prenatal ve postnatal etkenlerin BPD oluşunda rolleri olduğu bilinmektedir. Ancak, tanının ön koşulunu preterm doğum oluşturmaktadır.

Zaman içerisinde hastalığın önlenmesine yönelik bir takım prensipler tanımlanmış, bu prensiplerin hiçbiri BPD görülme sıklığının artışını engelleyememiştir.

Yenidoğan bakım ünitelerinde, solunum destekli akciğer hasarının, enfeksiyonların azaltılmasının, sağlıklı beslenme ile doğumdan sonraki ilk hafta içinde ilaç tedavisine başlanmasının BPD'nin görülme sıklığını azaltmada faydalı olduğu belirtilmiştir. (Tyson ve ark., 1999; Schmidt ve ark., 2008).

Bilindiği üzere, hamilelik dönemi ortalama 40 hafta sürmektedir. Hamileliğin 37. gebelik haftasının tamamlanmasından önce doğum gerçekleştiğinde bu olgu preterm olarak tanımlanmaktadır. Erken doğumlar, yılda 15 milyon bebeği etkileyen önemli bir sağlık sorununu oluşturmakla beraber, erken doğmuş bebeklerin yaklaşık %20'si 32. gebelik haftasından önce doğar ve çok erken doğmuş olarak sınıflandırılmaktadır (Blencowe ve ark., 2013; Martin, Hamilton ve Drake, 2018).

Gebeliğin 32. haftasından önce doğan bu bebeklerin hayatta kalması son birkaç yıl içerisinde önemli ölçüde iyileşme göstermiştir. Finlandiya'da yapılan bir araştırmada zamanından çok erken doğmuş bebeklerin %44'ünde yaşamın ilk üç

yılında bir veya daha fazla erken prematüre ilişkili morbidite saptandığı ortaya çıkmıştır (Korvenranta ve ark., 2009).

Yapılan bir diğer araştırmada, gebeliğin 23-24. haftalarında doğan akciğerleri olgunlaşmamış bebeklerin bile hayatta kalma oranının artmasıyla, BPD hastalığı gibi prematüre ilişkili morbiditelerin görülme sıklığının arttığı saptanmıştır (Stoll ve ark., 2015).

BPD, sürekli etkili oksijen yoğunluğu ve kuvvetli basınçlı mekanik ventilasyon uygulanan preterm yenidoğanlarda meydana gelen kronik bir akciğer hastalığıdır. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören bu hastalarda yüksek oranda mortalite görülmektedir. Pulmoner inflamasyon, BPD'nin patogenezi anahtar bir özelliği oluşturmaktadır.

BPD, aynı zamanda uzun vadeli nörogelişimsel yavaşlama riski ile ilişkilidir (Natarajan ve ark., 2012) ve çocukluk çağında ve gelişim döneminde devam eden bu sorun bozulmuş akciğer fonksiyonu ile birlikte (Baraldi ve Filippone, 2007) BPD'nin uzun vadeli sonuçları arasındadır.

BPD'nin patogenezi hakkında yapılan birçok araştırmalara rağmen, moleküler patogenezi bilinmemektedir ve hastalığı önleme yöntemleri yok denecek kadar azdır. Yapılan bazı diğer ikiz araştırmalarda da BPD'nin kalıtsal bir hastalık olduğu ileri sürülmektedir, ki bu genetik çalışmalar BPD patogenezi hakkında detaylı bilgi verebildiği belirtilmiştir (Bhandari ve ark. 2006; Lavoie, Pham ve Jang, 2008).

Bu doğrultuda, son birkaç yılda akciğer hasarını azaltmak için sürfaktan ve hassas ventilasyon tedavisinin getirilmesiyle perinatal bakımda önemli bir iyileştirme meydana gelmiştir, ancak diğer taraftan aşırı preterm bebeklerin hayatta kalması da sağlanmıştır. Bu nedenle, BPD insidansında herhangi bir değişiklik olmamış ve bu durum prematürelere en sık görülen geç morbidite olmaya devam etmektedir (McEvoy ve ark., 2014).

Pulmoner inflamasyon, BPD'nin patogenezinde anahtar bir özelliktir. Çeşitli risk faktörleri ile indüklenen bu inflamatuvar proses, inflamatuvar hücreler, sitokinler ve erken doğan prematürlerin pulmoner doku ve solunum yollarındaki humoral aracılardan varlığı ile karakterizedir. Ayrıca yapılan araştırmalar, erken doğan ve BPD'nin çeşitli evrelerindeki prematürlerin solunum yollarında, çok fazla sayıda inflamatuvar hücre bulunduğunu bildirmektedir. İnflamatuvar proses sırasında, çok sayıda aracı molekül, akciğer dokusunun yapısında, hücre bütünlüğünü etkileyen ve apoptoza indükleyen zararlı etkiler meydana getirmektedir. İnterlökin-8'in (IL-8) yanı sıra, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi diğer proinflamatuvar sitokinler erken inflamatuvar yanıtın gelişmesinde önemli aracı moleküllerdir. Bu sitokinler, hipoksi, hiperoksi, endotoksin, diğer bakteri hücre duvarı bileşenleri ve biyofiziksel faktörler ile uyarıldıklarında, alveolar makrofajlar, fibroblastlar, tip II pnömositler ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir (Kültürsay, 2003).

Akciğerlerde verimli bir gaz alışverişini sağlayabilmek için, artan akciğer yüzey alanına, ince bir alveolo-kılcal bariyer gerekmektedir. Bu değişiklikler akciğer gelişiminin sakküler ve alveolar aşamalarında meydana gelmektedir. Burada, ikincil ayrılma ve distal pulmoner mikrovasküler olgunlaşma sırasıyla yüzey alanını arttırmakta ve inspirasyon havası ile kan arasındaki mesafeyi en aza indirmektedir.

BPD daha önceleri hassas akciğerin ventilasyon ilişkili hasar görmesine bağlı akciğer dokusunda fibrozis gelişmesi ile karakterize olarak tanımlanıyordu. Daha nazik ventilasyon yöntemlerinin, antenatal steroid ve postnatal surfaktan tedavilerinin kullanıma girmesiyle birlikte BPD fenotipinde dramatik bir değişiklik gözlenmiştir. "Yeni BPD", azalmış alveolarizasyon ve vaskülarizasyona bağlı olarak akciğer gelişiminde duraksama ile karakterizedir (Jobe, 1999). BPD ilişkili akciğer hasarı geri dönüşümsüzdür ve ilişkili komplikasyonlar erişkin hayatta da devam etmektedir (Halvorsen, Skadberg, Eide ve ark., 2004; Aukland, 2009). Bu nedenle BPD hem hastanın hem de ailesinin yaşam kalitesi üzerinde oldukça etkili bir hastalıktır.

BPD gelişiminden inflamasyonun sorumlu olduğu ve bu inflamasyonun da mekanik ventilasyon, antenatal ve postnatal enfeksiyonlar ve hiperoksiye bağlı tetiklendiği düşünülmektedir (Ali, Schmidt, Dodd ve ark., 2013; Madurga ve ark., 2013).

Adipokinler (adipositokinler), adipoz doku tarafından salgılanan protein yapısında mediatörleridir. Adipokinler, sadece enerji metabolizmasının regülasyonunda değil, ayrıca çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklardaki inflamatuvar yanıtlarda da rol oynamaktadırlar (Fantuzzi, 2005; Ouchi ve ark., 2011). Adiponektin ve leptin gibi adipokinlerin, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklarda gerçekleşen inflamatuvar proseslerdeki anlamlı rollerine ilişkin çok fazla veri bulunmasına rağmen, nesfatin-1 ve visfatin gibi diğer adipokinlerin inflamatuvar akciğer hastalıklarındaki rollerine dair çok az bilgi bulunmaktadır.

Nesfatin-1, 2006 yılında ilk kez keşfedilmiş olan yeni bir adipokindir ve ilk olarak ratlarda yapılan açlık ve vücut ağırlığının kontrolü ile ilgili çalışmalar ile ilişkilendirilmiştir (Oh-I, Shimizu, Satoh ve ark.,2006). Nesfatin-1, insan adipoz dokusundan sentezlenmektedir ve yapılan çalışmalar TNF- α , IL-6, insulin, deksametazonun Nesfatin-1 sentezini artırdığını göstermiştir (Ramanjaneya, Chen, E. Brown ve ark., 2010). Nesfatin-1'in aynı zamanda, ratlarda inflamatuvar yanıtı ve hücre apoptozunu regüle ettiği (Tang ve ark., 2012), ve insanlarda kardiyoprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Angelone, Filice, Pasqua ve ark., 2013).

Akciğer hastalıklarında nesfatin-1 üzerine yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde akciğer kanseri hastalarında yağ kütlesindeki değişiklikler ile (Cetinkaya, Karagoz, Bilgi ve ark., 2013) diğerinde de kistik fibrozis ile (Cohen ve ark., 2013) ilişkili olduğu bulunmuştur.

Visfatin, aynı zamanda nikotinamid fosforibozil-transferaz (NAMPT) adı ile bilinmektedir ve ilk başta lenfositler, kemik iliği, karaciğer ve kaslarda tanımlanmış

iken (Samal ve ark., 1994), daha sonra varlığı akciğerlerde de gösterilmiştir (Adeghate ve ark., 2008). Proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-1 (IL-1)'in pulmoner epitelyal ve endotel hücrelerinde visfatin ekspresyonunu artırdığı in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir (Liu, Li, Cepeda ve ark., 2009.). Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 (Ognjanovic ve Bryant-Greenwood, 2002.) ve TNF- α 'nın (Iqbal ve Zaidi, 2006) da visfatin ekspresyonunu uyardığı bildirilmiştir. Granulositler ve monositler, visfatinin major kaynakları olup (Friebe, Neef, Kratzsch ve ark., 2011), visfatin ayrıca makrofajlar ve adipositler tarafından da üretilmektedir (Curat ve ark., 2006). Visfatinin inflamasyon ve doğal bağışıklığın regülasyonunda yer alan proinflamatuvar bir sitokin olduğu bildirilmektedir (Moschen ve ark., 2007; Luk, Malam, ve Marshall, 2008). Visfatin akciğerlerde gelişen akut akciğer hasarı ile ilişkili bulunmuştur (Ye, Simon, Maloney ve ark., 2005) ve visfatin sentezinin inhibisyonunun, inflamasyonu ve akciğer endotelinde şiddetli virus infeksiyonu ile ilişkili apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (Gao, Mao, Feng ve ark., 2011).

IL-8'in yanısıra, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinler de erken inflamatuvar yanıtın önemli mediatörleridir. Bu sitokinler, hipoksi, hiperoksi, endotoksin ve diğer bakteri hücresi bileşenleri ile biyofiziksel faktörler tarafından uyarıldıklarında, alveolar makrofajlar, fibroblastlar, tip-2 pnömositler ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir (Lundstrom ve ark., 2000; Jobe ve Ikegami, 1998). BPD gelişen yenidoğanların solunum yolu salgıları ve bronkoalveolar hücrelerinde bu proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-8 ve TNF- α) protein düzeylerinin arttığı ve mRNA sekresyonlarının up-regüle olduğu bildirilmiştir (Rindfleisch ve ark., 1996; Jones ve ark., 1996; Kotecha ve ark., 1996; LoMonaco ve ark., 1996; Jonsson ve ark., 1997)

Erken doğan ve respiratuvar distress sendromu (RDS) nedeni ile kaybedilen bebeklerde, pulmoner dokuda TNF- α pozitif makrofajların akışının, endotel membran bütünlüğünün kaybı ve interstisyel glukozaminoglikanların yıkımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Murch ve ark., 1996). Yapılan çalışmalar, bronkoalveolar epitelde ve RDS'li infantların post-mortem akciğer dokularının

interstisyel dokusunda, belirgin bir IL-8 mRNA ekspresyonu saptandığını bildirmektedir (Schmidt ve ark., 2001).

Erken doğan infantların solunum yollarında ve pulmoner dokularında gözlenen artmış proinflamatuar sitokin düzeyleri ve artmış mRNA ekspresyonu, interlökin-4, interlökin-10, interlökin-12 ve interlökin-13 gibi antiinflamatuar sitokinlerin ya da IL-1 gibi reseptör antagonistlerinin yeterli eksprese olamamalarını ve buna bağlı olarak enflamasyonu düzenlemedeki yetersizliğini yansıtmaktadır (Jones ve ark., 1996; Baier ve ark., 2003; Kakker ve ark., 2004).

Hücresele IL-10 mRNA düzeyleri, RDS'li yenidoğanların solunum yolu örneklerinin çoğunda saptanamamakla birlikte, normal doğan bebeklerin tüm hücresele örneklerinde eksprese olduğu bildirilmiştir (Jones ve ark., 1996). Bununla birlikte, erken doğan infantların, *in vitro* IL-10'a maruz kalan akciğer inflamatuvar hücrelerinde proinflamatuar sitokin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Kwong, ve ark., 1998). Proinflamatuar ve antiinflamatuar sitokinler arasında bir dengenin olmaması akciğer hasarının en kritik özelliği olarak kabul edilmektedir (Keane ve Strieter, 2002).

Çalışmamızda, BPD tanısı konmuş hastalarda, son yıllarda tanımlanmış olan yeni adipositokinler ile inflamatuvar mikroçevre ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. BPD tanısı konmuş hastalardan serum ve RNA örneklerinin toplanarak, elde edilen örneklerde, inflamasyondaki rolleri son yıllarda saptanmış olan Nesfatin-1 ve visfatin adipositokinlerinin plazma düzeylerinin tayini, Nesfatin-1 ve visfatin mRNA ekspresyonlarının analizi, BPD ile ilişkili olduğu gösterilen, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Nf- κ B ve MMP-9 proteinlerinin plazma düzeyleri, inflamasyon belirteçlerinden MMP-9 mRNA ekspresyonunu tayinleri yapıldı, elde edilen sonuçların sağlıklı kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırılması ve korelasyon analizleri yapılmıştır.

1.1.Genel Bilgiler

BPD, erken doğum ile ilişkili en mühim kronik pulmoner hastalık gösterne ve ölüm nedenlerinden biridir. Hamilelik süresine ve yeni doğanın doğum ağırlığına bağlı olarak meydana gelen Respiratuar Distres Sendromu (RDS) prematüre bebeklerin % 1'i ile % 70'i arasında BPD geliştirebilmektedir. BPD, uzun süreli oksijen bağımlılığı ve anormal göğüs radyolojik bulguları ile karakterize bir sağlık sorunudur (Sly ve ark., 1996; Bancalari ve ark., 2003).

Türkiye'de, adölesan gebelikler, doğum sonrası ilk solunum desteği şekillerinin farklılık göstermesi, farklı doz surfaktan uygulamaları, postnatal enfeksiyonlardan korunma, tanı ve tedavi protokollerinin farklı olmaları, sıvı ve elektrolit tedavi desteğinin değişkenlik göstermesi BPD gelişiminde etkisi olduğu bilinen etkenler arasında yer almaktadır (Arşan ve ark., 2018).

BPD ilk kez 1967 yılında Northway ve arkadaşları tarafından yapılan araşırmada tanımlanmıştır. Araşırmacılar, kesintisiz pozitif basınçlı ventilasyon ve % 80'den daha fazla yoğunlukta oksijen ile tedavi edilen RDS tanısı almış olan yenidoğan bebeklerde gelişen kronik solunum işlev bozukluğunun klinik, radyolojik ve patolojik tarifini yapmışlar ve bu olguyu BPD olarak isimlendirmişlerdir (Northway ve ark., 1967).

Günümüzde, BPD özellikle doğum ağırlığı 1500 g altında ve gebelik yaşı 28 hafta olarak doğan bebeklerde gözlenen bir hastalıktır. Bu dönemde doğan bebekler, "klasik BPD" nin temelini oluşturmaktadırlar ve 31 haftalık gebelikten sonra doğan bebeklerden çok daha az olgunlaşmış bir fizyolojik duruma sahiptirler.

Son yıllarda bu konuda yapılan klinik çalışmalarda, klasik ve yeni BPD arasında farklılıklar, etiyolojik olarak bebek sağlığına zararlı olma olasılığı yüksek

olan faktörler, takip / tedavi protokolleri, koruyucu tedbirler araştırılmaya devam etmektedir. Klasik BPD tanısı almış hastaların otopsilerinde, inflamasyon, fibroz, ve buna benzer akciğer dokusu zedelenmeleri dikkat çekmektedir. Yeni BPD tanısı almış olan hastaların akciğerlerinde ise, daha az miktarda fibrozun tespit edildiği ifade edilmektedir. Bu patolojik duruma neden olan en önemli zemin yaratıcı etmenler arasında, hava yollarındaki uyum bozukluğu, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar bağlantıların yetersizliği, olgun olmayan makrofaj ve nötrofil fonksiyon bozuklukları sonucu akciğer gaz alışverişinde bozulma, akciğer yüzey etken madde sentezinde duraklama olarak ifade edilmektedir (Welty 2000; Jobe ve Bancalari 2001).

Hasta olma olasılığı yüksek olan bebeklerde antioksidan sistemlerindeki yetersizlik nedeniyle, yüksek basınç ve uzun vadede oksijen tedavisi uygulamak akciğer hasarına neden olabilmektedir. Bu nedenle BPD hastalığını önleyici yaklaşımlarda daha düşük yoğunlukta oksijen verilmesi öngörülmektedir. Bu süreçte, antioksidan mekanizmayı arttırmak için süperoksit dismutaz enziminin uygulanması önerisi, deneysel aşamada kalmış olup, klinik uygulamaya geçemediği yapılan araştırmalarda ifade edilmiştir (Ozkan ve ark., 2008).

Akciğerlerde, mukus tarafından kaplanan solunum epitelyumu mikroorganizmaları yakalamakta ve siliyer epitel hücreleri mukusu akciğerlerden uzaklaştırmaktadır. Yerleşik alveoler makrofajlar, solunum epitelyumu ile birlikte akciğerlerdeki ilk savunma sistemini oluşturmaktadır ve makrofajlar, fagositoz ile yabancı maddelerin temizlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (Marieb, 2001).

Pulmoner inflamasyon, BPD'nin patogenezinde anahtar bir özelliktir. Çeşitli risk faktörleri ile indüklenen bu inflamatuvar proses, inflamatuvar hücreler, sitokinler ve erken doğan prematürlerin pulmoner doku ve solunum yollarındaki humoral araçların varlığı ile karakterizedir. Ayrıca yapılan araştırmalar, erken doğan ve BPD'nin çeşitli evrelerindeki prematürelerin solunum yollarında, çok fazla sayıda inflamatuvar hücre bulunduğunu bildirmektedir. İnflamatuvar proses sırasında, çok

sayıda aracı molekül, akciğer dokusunun yapısında, hücre bütünlüğünü etkileyen ve apoptozu indükleyen zararlı etkiler meydana getirmektedir. İnterlökin-8'in (IL-8) yanı sıra, IL-4, IL-6 ve TNF- α , gibi diğer proinflamatuvar sitokinler erken inflamatuvar yanıtın gelişmesinde önemli aracı moleküllerdir. Bu sitokinler, hipoksi, hiperoksi, endotoksin, diğer bakteri hücre duvarı bileşenleri ve biyofiziksel faktörler ile uyarıldıklarında, alveolar makrofajlar, fibroblastlar, tip II pnömositler ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir (Kültürsay, 2003).

Sitokinler, normal ve patolojik koşullar altında hücrelerin aktivitesini modüle eden peptitler ve protein yapısında moleküllerdir. Birçok sitokinin inflamasyon önleyici özelliği bulunmaktadır. Bununla birlikte, aynı sitokin hem pro- hem de anti-inflamatuvar özelliklere sahip olabilmektedir. Lökositlere ek olarak, bronşiyolar epitel hücreleri ve alveolar tip II hücreler, inflamatuvar hücrelerin akciğere infiltrasyonunu teşvik etmek için bu maddeleri çekici özellikte maddeler salgılayabilmektedirler (O'Brien ve ark., 1998; Fehrenbach, 2001).

Nötrofiller, genel olarak inflamatuvar yanıt bölgesine sızan ilk inflamatuvar hücrelerdir (Kaplanski ve ark., 2003). Akciğer monosit ve makrofajlarının etki artışı için önemli oldukları öne sürülmüştür (Janardhan ve ark. 2006).

1.1.1. Akciğerlerin Yapısı ve Gelişimi

Bilindiği üzere, akciğerlerin ana görevi oksijeni havadan alıp kan dolaşımına taşımak ve oluşan karbondioksiti kan dolaşımından atmosfere salmaktır. Gaz değişimi periferel akciğerdeki ince alveoler-kılcal zar içindeki epitelyal hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir (Marieb, 2001).

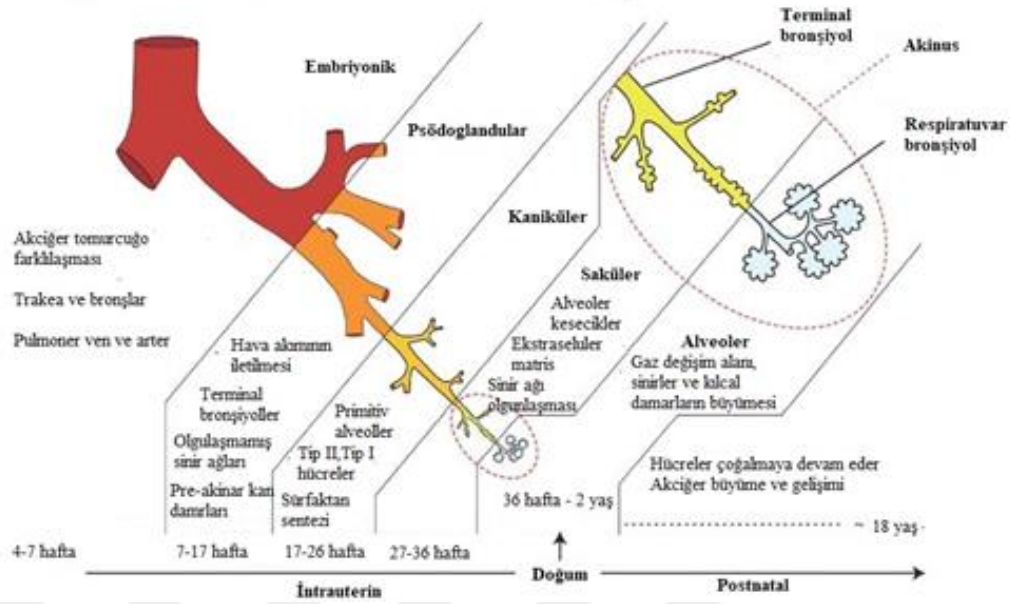
Solunum sistemi, iletken bölge ve solunum bölgelerinden oluşmaktadır. İletken bölge trakea, bronşlar, bronşiyoller ve terminal bronşiyollerini içermektedir. Hava yolu

epitelyumu siliyer hücreler, bazal hücreler ve mukus üreten goblet hücreleri içermektedir. İletken bölgenin temel görevi; havayı gaz değişim bölgesine doğru aktarmak, solunan havayı nemlendirmek ve ısıtmak, hava yolunu yaralanmalardan korumak için toz ve bakteri gibi tahriş edici maddeleri uzaklaştırmaktır. Solunum bölgesi ise gaz değişiminin gerçek bölgeleri olan solunum bronşiyolları, alveolar kanallar ve alveolleri içermektedir (Marieb, 2001).

İnsanlarda akciğer gelişimi, embriyonik, psödoglandular, kanaliküler, sakküler ve alveolar olmak üzere beş aşamadan oluşmaktadır (Çizelge 1.1 ve Şekil 1.1.).

Çizelge 1.1. Akciğerlerin gelişim aşamaları (Kajekar 2007).

Evre	Gebelik haftası	Gelişme
Embriyonik	0-7	Akciğer tomurcukları oluşur. Kan damarları kalbe bağlanır.
Psödoglandular	7-17	Asinar öncesi hava yolları ve kan damarları gelişir.
Kanalikuler	17-27	Solunum bölgesi gelişir. Tip I ve tip II pnömosit oluşumu başlar.
Saküler	28-36	Sakül gelişimi başlar.
Alveoler	30-18 ay	Alveollerin gelişimi. Alveoller ve küçük kan damarları çoğalır. Tüm yapıların büyüklüğü artar.



Şekil 1.1. Akciğerlerin normal gelişim evreleri (Kajekar 2007).

1.1.1.1. Embriyonik Evre

Akciğer gelişiminin embriyonik aşaması, ön bağırsak (foregut) endodermal epitelyumdan bir büyüme oluşumu ile başlamaktadır. Büyüme, ilkel yemek borusundan trakeal temelini oluşturmak için ayrılmakta ve akciğeri beş loba bölmek için çevredeki mezenkim içine dallanan iki birincil bronş tomurcuğu oluşumuna yol açmaktadır. (Jobe, 2002; Maeda ve ark., 2007).

1.1.1.2. Psödoglandüler Evre

Psödoglandüler aşamada, hava yollarının ve vasküler sistemin dallanması devam etmekte ve iletken hava yolları, terminal bronşiyoller ve ilkel asiner yapılarla bronş ağacı oluşturulmaktadır. Epitel hücrelerinin farklılaşması ana bronşlarda siliyer hücrelerin, goblet hücrelerinin ve bazal hücrelerin ortaya çıkmasına neden

olmaktadır (Jobe, 2002). Vasküler sistem bronşiyal ve bronşiyolar túbüller boyunca gelişmektedir (Jobe, 2002).

1.1.1.3. Kanaliküler Evre

Solunum yapıları, kanaliküler aşamada asiner túbül ve tomurcuk kümeleri oluşturmak için daha fazla alt bölüme ve genişlemeye maruz kalmaktadır. Epitelyal farklılaşma, solunum ağacının periferal kısmında yoğunlaşır ve buna, epitel ile yakın ilişkide, asinar içi çift kılcak ağın büyümesi ve gelişmesi eşlik etmektedir (Jobe, 2002). Bu aşamada, farklılaşmış bronşiyoller Clara hücreleri CCSP'yi (Clara Hücre Sekretuar Protein) (Singh ve ark., 1988; Zhou ve ark., 1996) sentezlemeye başlamakta ve kübik hücreler özel tip II epitel hücrelerine ve daha sonra oluşacak tip I epitel hücrelerine farklılaşmaktadır (Jobe, 2002).

1.1.1.4. Sakküler Evre

Bu aşamada terminal bronşiyollere uzak olan segmentler genişleyip büyümektedir. Bu durum, alveoler keseciklerin ve kanalların oluşumuna ve interstisyel dokunun azalmasına neden olmaktadır. Periferik epitel hücreleri farklılaşmaya devam etmekte ve kılcak damarlar tip I epitel hücreleri ile daha yakından ilişkili hale gelmektedir. (Burri, 2006; Jobe, 2002).

1.1.1.5. Alveoler Evre

Alveoler aşamada, kesecikler daha küçük alveollere bölünmektedir. Meydana gelen alveoler duvarlar çift kılcak damarları ve bağ dokusu içermektedir. Alveolarizasyon sırasında doğumdan sonra etkin gaz alışverişini sağlamak için tek bir kılcak tabaka oluşmaktadır (Burri, 2006). Alveolarizasyon erken çocukluk döneminde devam etmektedir. Doğumda, insan akciğerinde 50-150 milyon alveol

bulunurken, yetişkin akciğeri 300 milyon alveol içermektedir (Burri, 2006; Jobe, 2002).

Sürfaktanlar, alveoler tip II hücrelerden senten edilip salınmakta ve alveoler membranın önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Alveoler hava boşluğunda yüzey gerilimini bir dereceye kadar azaltarak akciğer periferinde uygun ventilasyonu sağlamaktadır (Dobbs, 1989). Sürfaktan, lipid ve proteinden oluşan kompleks bir yapıdadır ve bu yapıların her biri karbonhidrat öğeleri içermektedir (Kim ve ark., 1989; Wright ve Hawgood 1989; Rich, 1990; Masmonteil, 1993; Kliegman RM. 1996;)

Sürfaktanlar, lipid ve proteinlerden oluşmakla beraber her iki yapıda da karbonhidrat yapıları bulunmuşur. Lipidler, sürfaktanların % 80 ila % 90'nı oluşturmaktadırlar (Wright ve Hawgood 1989; Rich 1990). Lipid kısmının % 90'ı fosfolipid karışımında % 10'u ise kolesterolden oluşmaktadır (Masmonteil 1993). Akciğer sürfaktanlarının %10'luk kısmı proteinlerden oluşmaktadır. Bunun %80'ini serum proteinleri, %20'sini ise sürfaktan'a spesifik proteinler oluşturmaktadır (Wright ve Hawgood 1989; Wirtz ve Schmidt, 1992; Steayer ve ark., 1993; Longo ve ark., 1993). Sürfaktan'a spesifik dört adet protein tanımlanmıştır. Bunlar; SP-A, SP-B, SP-C ve SDP-D isimli proteinlerdir (Possmayer, 1990; Wright ve Youmans, 1993; Masmonteil TL, 1993).

1.2. Bronkopulmoner Displazi

1.2.1.Tanım

BPD, ilk kez 1967 yılında Northway ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile tanımlanmıştır. Klasik BPD olarak bilinen hastalığın günümüze kadari tarifi, epidemiyolojisi, patogenezi ve klinik olguları hakkında farklı fikirler ileri

sürülmüştür. Northway ve arkadaşlarının 1967 yılında yapay solunum ve oksijen tedavisi uygulanan ağır RDS tanısı almış olan 32 bebeğin değerlendirildiği çalışmalarında BPD hastalığının klinik, patolojik ve radyolojik verileri ile birlikte tanımlamışlardır (Northway ve ark., 1967).

Northway ve arkadaşları tarafından yapılan BPD tanımı, mekanik ventilasyon ve oksijen takviyesi ile tedavi edilen RDS tanısı almış prematüre bebeklerdeki radyolojik ve patolojik özelliklerine dayanmaktadır.

1.2.1.1. Klasik Bronkopulmoner Displazi

Araştırmacılar, prematürelerin RDS nedeni ile sürekli yüksek basınçlı yapay solunum ve %80'den daha yüksek konsantrasyonda oksijen tedavisi sonucu akciğerlerinde oluşan patolojik ve radyolojik değişiklikler olarak tanımlamışlar ve 4 evreye ayırarak incelemişlerdir (Coalson 2003).

Evre I (2-3 Gün): Bu evre klinik ve radyolojik bulgular ile karakterize olan RDS hastalığının akut fazını işaret etmektedir.

Evre II (4-10 Gün): Bir yenilenme dönemidir. Hastaların önemli düzeyde oksijen bağımlılığı bulunmaktadır. Yüzde %80-%90 arasında olan yüksek oksijen konsantrasyonu düşürülmeye çalışılır. Göğüs radyografisinde her iki akciğer opak gözükmektedir.

Evre III (10-20 Gün): Kronik akciğer hastalığına geçiş dönemini göstermektedir. Göğüs radyografisinde düzensiz şekilli yoğunluklar ve kist lezyonları alanları yer almaktadır. Yoğunluk alanlarında küçük bronşiyollerin lümen kalıntısı ile tıkanması nedeniyle interstisyel ödem ya da atelektazi görülmektedir. Bu dönem kronik hastalığa ilerleme dönemini oluşturmaktadır.

Evre IV (1 aydan fazla): Süregelen akciğer hastalığı tablosu yerleşmiştir. Göğüs radyografisinde ventrikül hipertrofi, belirgin fibroz ve ödem görülmekte bu bulgular da kronik akciğer hastalığının önemli bulgularını ifade etmektedir (Northway ve ark., 1967; Northway 1990).

Northway ve arkadaşlarının 1967 yılında yapmış oldukları klasik BPD tanımı ve tanı ölçütleri geçen yıllar içerisinde çeşitli bilim insanları tarafından yenilenmiştir. Yapılan araştırmalarca, prematüre bebeklerde, başta RDS tanısı için surfaktan tedavisi, daha nazik ve yaygın olmayan solunum destek uygulamaları olarak sıralanabilecek çeşitli klinik yöntemlerin gündeme gelmesi ile çok düşük gebelik haftasında doğan prematürelere yaşamaya başlamış ve bunlarda görülen kronik solunum yetmezliği “Yeni BPD” olarak tanımlanmıştır (Jobe ve Bancalari 2001).

Yeni BPD tanımı, akciğerlerin zedelenme ve onarım süreçlerinden etkilenme derecesini şeffaf olarak yansıtmamakta ve hedef hasta grubu olan “ağır BPD” adayı prematürelere tanımlayabilmekten uzak olduğu tespit edilmiştir (Pointdexter ve ark., 2015).

Akciğerlerin durumu hakkında daha duyarlı ve geçerli bir klinik tanımlama kabul görene dek, Jobe ve Bancalari'nin (2001) Ulusal Sağlık Enstitüleri Çalıştayı'nda önerdikleri ve günümüzde en yaygın olarak kullanılan BPD tanım ve sınıflamasının Türkiye'de kullanılması önerilmektedir (Jobe ve Bancalari 2001) (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Bronkopulmoner displazi sınıflandırılması.

Değerlendirme zamanı	Gebelik yaşı <32 hafta	Gebelik yaşı ≥32 hafta
		Postmenstrüel 36. haftada veya taburculuk esnasında (öncelik sırasına göre değişebilmekte)
Hafif BPD	En az 28 gün \geq %21 O ₂ gereksinimi + postmenstrüel 36. haftada veya taburculuk sırasında (öncelik sırasına göre değişebilmekte) ek O ₂ gereksiniminin olmaması	En az 28 gün \geq %21 O ₂ gereksinimi + postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (öncelik sırasına göre değişebilmekte) ek O ₂ gereksiniminin olmaması
Orta BPD	Postmenstrüel 36. hafta veya taburculuk sırasında (öncelik sırasına göre değişebilmekte) <%30 ek O ₂ gereksiniminin olması	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (öncelik sırasına göre değişebilmekte) <%30 ek O ₂ gereksiniminin olması
Ağır BPD	Postmenstrüel 36. hafta ya da taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) \geq %30 O ₂ gereksinimi ve/veya pozitif basınç gereksinimi	Postnatal 56. gün ya da taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) \geq %30 O ₂ gereksinimi veya pozitif basınç gereksinimi

1.2.2. Etiyolojisi

BPD hemen hemen yalnızca yapay solunum ve oksijen tedavisi almış olan olgularda meydana geldiği için, etiyolojisinde erken doğan, travma ve oksijen toksisitesi en önemli etkenler olarak kabul edilmekle birlikte, birçok etkenin ayrı ayrı ya da birlikte rol oynadığı bilinmektedir.

1.2.2.1. BPD Etiyolojisinde Risk Faktörleri

BPD için birçok etkenin risk teşkil ettiği bilinmektedir. Bu etkenlerin tek başına ya da çoğunun bir arada gözlemlendiği durumlar olabilmektedir.

- *Prematürite ve immatürite*

En önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Gebelik yaşı ile doğum ağırlığı düşüktüğü BPD meydana gelme olasılığı da hızla yükselmektedir. Erken doğumu takiben gelişebilen RDS nedeni ile uygulanan oksijen uygulamaları akciğer gelişimini etkilemekte, alveoller ile vasküler gelişim arasındaki dengeyi bozmaktadır.

- Mekanik Ventilasyon

Akciğerlerde gerilmeye neden olmaktadır. Akciğerlerde vasküler direnç artmakta ve endotel hasarı meydana gelmektedir. Neticede damar geçirgenliği artarak pulmoner sıvıda artış meydana gelmektedir. Nötrofillerin birikimi artmaktadır, bu durum inflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasına neden olmaktadır (Jobe ve Bancalari 2001, Taghizade ve ark., 1976).

- *Hiperoksi / Oksidatif Stres / Yetersiz Antioksidan Sistem*

Normal bebeklere kıyasla, prematüre bebeklerin yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalma süreleri fazladır. Bu yenidoğanların oksidatif stres durumu ile karşı karşıya kalmalarına neden olabilmektedir. Artmış olan oksidatif stres ürünlerinin uzaklaştırılmasında, antioksidan savunma mekanizmalarında da yetersizlik olduğu da bilinmektedir (Jobe ve Bancalari, 2001).

Yapılan bir çalışmada, oksijen radikali teşkilini azaltmak ve BPD hastalığını önlemek için uygulanan allopurinol etken maddesi ile tedavi denemelerinin başarılı olmadığı açıklanmıştır (Russell ve Cooke 1995).

Glutasyonun serum seviyesini arttırmak amacı ile, prekürsörü olan N-asetilsistein uygulamasının, BPD sıklığında herhangi bir azalma sağlamadığı bildirilmiştir (Ahola ve ark., 2003).

- *Antenatal ve Postnatal İnflamasyon/Enfeksiyon*

BPD gelişiminde en kritik patofizyolojik mekanizmalardan birisi antenatal dönemde meydana gelen inflamasyon eyav enfeksiyondur. Klinik koriyoamniyonitis bunun en tipik örneğidir ve pulmoner enfeksiyonlar da benzer şekilde etki etmektedir (Speer 2001).

Antenatal inflamasyon ve enfeksiyon belirtileri en çok klinik ya da histolojik koriyoamniyonit olgularında çalışılmıştır. Histolojik koriyoamniyonit önemli bir olgudur. Bu inflamasyona yanıt, kord kanında IL-6 seviyesinin yüksek bulunması ile karakterizedir. Bu sitokin seviyesinin artışı, inflamatuvar hücrelerin amniyon sıvısına sızmasına ve fetusta metalloproteinazların aktif hale gelmesine neden olmaktadır (Gomez ve ark., 1998).

Sonuçta inflamasyon ile karşılaşan fetusta erken akciğer olgunlaşması ortaya çıkmaktadır (Gomez ve ark., 1998). Bu durum, BPD oluşumu için bir zemin oluşturmaktadır.

Crowley tarafından yapılan araştırmada (1995), doğum öncesi glukokortikoid uygulamaları sonucunda RDS sıklığının % 50 oranında azaltılmasına karşılık BPD sıklığının azalmadığı belirtilmiştir.

- *Pulmoner Ödem*

Pulmoner sıvı yüklenmesi sonucu akciğer kan akışı ve dokular arası sıvı hacmi yükselmektedir; neticede, akciğer uyumu azalmakta, hava yolu direnci artışı nedeni ile oksijen ihtiyacı artmaktadır. Pulmoner kan akımındaki artış, akciğerlerde nötrofillerin aktivasyonunda ve dolayısıyla birikmesine yol açmaktadır (Van Marter ve ark., 1990). Bu gelişen olaylar inflamatuvar kaskadın hızla ilerlemesine neden olarak BPD riskini artıran faktörleri oluşturmaktadır.

- *Genetik faktörler*

BPD'ye genetik yatkınlık, surfaktan sistemindeki anormallikler, alveolar dokunun farklılaşmasındaki sorunlar, solunum yolu gelişmesinde rol oynayan proteinlerde meydana gelen mutasyonlar, pulmoner damar yatağı kontrol eden mekanizmalardaki sorunlardan sağlandığı bilinmektedir (Hallman ve Haataja 2003).

BPD gelişiminde, surfaktan proteinlerin rolü olduğu ifade edilmiş ve genetik faktörlerin etkilerini belirlemek için surfaktan çalışmaları yapılmıştır. Surfaktanlar, yüzey gerilimini azaltarak alveollerin açık kalmasını sağlamaktadırlar. Surfaktan eksikliğinde atelektaziler meydana gelmekte ve buna bağlı olarak ta gaz alışverişinin bozulması durumu söz konusu olmaktadır (Northway ve ark., 1967; Bancalari ve ark., 2003).

- *Diğer Risk Faktörleri*

Yetersiz beslenme sonucunda oluşan sorunlar, sürrenal yetmezlik, gebelik yaşı ve doğum ağırlığının tutarsız olması, ilerlemiş RDS tanısı ve erkek cinsiyetin BPD için risk oluşturduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Smyth ve ark., 1981, Watterberg ve Scott 1995; Watterberg ve ark., 1999).

1.2.3. İnsidansı

Bronkopulmoner displazi tanımının değişkenlik göstermesinden dolayı, hastalığın sıklığını doğru olarak ifade etmekte güçlük yaşanmaktadır.

Northway'ın 1967 yılında yaptığı "Klasik BPD" tanımının yerini 2000'li yıllarda, 30'ncu gebelik haftasında ve 1200 gramdan daha büyük bebeklerde, nadir görülen "Yeni BPD" tanımı almıştır (Ehrenkranz ve ark., 2005, Bhandari ve Bhandar 2007). NICHD'in (Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development) 1993-1994 yılları arasında prematürelde 36. gebelik haftasında oksijen gereksinimine göre tanımlanan BPD sıklığı yaklaşık %19 olarak gözlemlenmişken, 1995-1996 yıllarını kapsayan dönemde araştırmalar 1500 gr'dan daha küçük prematürelde BPD sıklığını %23 olarak gözlemlenmiştir (Stevenson ve ark., 1998; Lemons ve ark., 2001).

George Washington Üniversitesi 1500 gram'dan düşük bebeklerde BPD görülme sıklığının yıllara göre 1997'de %40, 2005 yılında ise yaklaşık %10 oranında saptandığı bildirmiştir.

Breathsavers Grup Hastaneleri tarafından yapılan araştırmada ise, 501 ila 1500 gram arası doğan bebeklerde BPD meydana gelme oranının 2003 yılında, 2001 yılına göre daha düşük oranda bulunduğu, 2001 yılında BPD görülme sıklığı % 36,6 iken 2003 yılında bu sıklık %26,8 olarak tespit edildiği ifade edilmiştir. Katılımcı hastanelerin 2001 yılındaki BPD sıklığı % 13 ile % 66 arasında değişirken, 2003

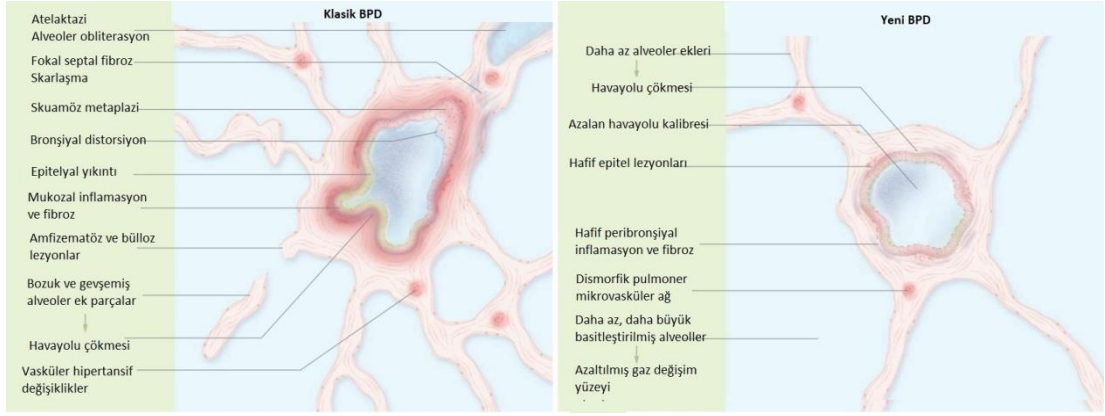
yılında bu oranların % 4 ve % 58 arasında, daha düşük bir oranda tespit edildiği ilan edilmiştir (Lemons ve ark. 2001).

Bir diğer araştırmaya göre; 26. gebelik haftasından daha küçük olan bebeklerde mortalite % 28,6 bulunurken, BPD sıklığı % 40,4 olarak saptanmıştır. 26.- 27. gebelik haftası arasında olan bebeklerde ölüm oranı % 10,8, BPD sıklığı % 51; 28-31. gebelik haftası arasındaki bebeklerde ölüm oranı % 3, BPD sıklığı % 19,3; 32. gebelik haftası altında tüm bebeklerde ölüm oranı % 8,8 ve BPD sıklığı % 29 olarak bulunmuştur (Thomas ve ark., 2005).

1.3. Patolojisi

Hava yolu zedelenmesi ve inflamasyonu, hava yolu epitelyal hücre metaplazisi ve parankimal fibroz, "klasik BPD"-nin patolojik olaylarını açıklarken; akciğer gelişiminin bozulması "yeni BPD"-nin karakteristik morfolojisini açıklamaktadır (Baraldi ve Filippone 2007) (Şekil 1.2.).

"Klasik BPD" ve "Yeni BPD", farklı olgunluktaki akciğerleri zedeleyebilen faktörlerin değişken kombinasyonlarının iki farklı morfolojik sonucunu doğurmaktadır. Klasik BPD'de, yoğun inflamasyon ve normal pulmoner yapıların bozulması, homojen olmayan bir hava yolu ve parankimal bozukluğa yol açarken, yeni BPD'de daha hafif hava yolu hasarı, inflamasyon ve fibroz ile klinik olarak önemli bir yüzey alanı kaybı ile ilişkili olan alveoler gelişiminin yaygın olarak azalması gözlenmektedir (Baraldi ve Filippone 2007).



Şekil 1.2. Klasik ve yeni BPD hava yolu ve parankimal hasarı (Baraldi ve Filippone 2007).

Bronkopolmoner displazi'nin patogenezi, belirgin derecede olgunlaşmamış akciğer yapısı, yüksek ve yoğun oksijen tedavisinin neden olduğu volutravma ve barotravma hasarı, akciğer hasarlarına neden olan bir inflamatuvar cevap ve herhangi bir derecedeki düzensiz onarımı kapsamaktadır (Coalson 2003).

1.4. BPD'de Koruma ve Tedavi Yaklaşımları

1.4.1. Oksijen Tedavisi

BPD tanısı almış bebeklerde oksijen tedavi gereksinimi, eve taburculuk için engel teşkil etmemektedir. Eğer sabit bir oksijen konsantrasyonu ve satürasyonu sağlanabiliyor ise, hipoksik atak geçirilmiyorsa, evde oksijen tedavisi ile hasta izleme devam edebilir.

Oksijen satürasyonunu % 93 ve üzeri seviyesinin üzerinde tutamayan ve destek oksijen tedavisi almadığında sık sık desatüre olan hastalar eve oksijen desteği ile taburcu edilmemelidirler (Arşan ve ark., 2014).

1.4.2. Surfaktan Tedavisi

Ballard ve ark., (2016)'nın yaptığı çalışmada, gebelik yaşı 28 haftadan az olan ve 7-14. günleri arasında hala yapay mekanik ventilasyon desteği yanında, inhale nitrik oksit tedavisi almakta olan prematüre bebeklerde, 1 ile 3 gün aralıklarla, toplam beş doza kadar çoklu surfaktan tedavisi uygulaması, postmenstrüel 36-40. haftalarda BPD hastalığını azaltmadığı gösterilmiştir

1.4.3. Metilksantinler

Diafragmanın kasılmasını kuvvetlendirirler. Zayıf bronkodilatatör ve diüretik etkileri de bulunmaktadır. Söz konusu ilaçların, başarılı enstübasyon oranını arttırarak, BPD'yi azalttığı saptanmıştır (Schmidt ve ark., 2006).

1.4.4. Steroidler

BPD tanısı almış olan hastalarda sıklıkla kullanılan, üzerinde en çok çalışılan; ancak, halen standart bir kullanım rehberi bulunmayan ilaç gruplarıdır. Bu gruptaki ilaçlar uzun dönem kullanıldığında olumsuz nörolojik ve pulmoner yan etkilerine karşın, akciğer hasarı nedeni ile mekanik ventilasyondan uzaklaşamayan prematüre bebeklerin eKstübasyonu için bilinen en etkili ilaç grubunu oluşturmaktadır. Bu grup ilaçlar parenteral veya enteral yoldan, sistemik olarak ya da inhalasyon ile lokal olarak uygulanabilirler. Uygulama yolları farketmeksizin, kullanım kararı alınırken ilacın etkileri ve yan etkileri her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

Steroidler, akciğerdeki inflamasyonu azaltmakta, kendilerine özgü sitoplazmik reseptörlere bağlanarak doğrudan DNA'ya tutunarak, genlerin transkripsiyonunda değişiklik meydana getirmektedirler. Pekçok proinflamatuvar proteini azaltırken, antinflamatuvar proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadırlar (Halliday ve ark., 2003).

Yapılan bir araştırmada, postnatal steroid kullanımı ile ilişkili kısa dönem ve uzun dönem komplikasyonlar olarak; hiperglisemi, hipertansiyon, artmış adrenal bezde baskılanma, gelişme geriliği ve geç dönemde nörogelişimsel bozukluklar olduğu rapor edilmiştir. (O'Shea ve ark., 1999; Stark ve ark., 2001).

Yine bir başka araştırmada, postnatal steroid uygulamasının BPD olma riski taşıyan hastaların % 50'sinde faydalı olduğu gösterilmiştir (Doyle ve ark., 2005).

1.4.5. A Vitamini

A vitamini, akciğer büyümesi, tamiri ve solunum yolu epitelinin bütünlüğünün sağlanması için elzemdir. Güçlü bir antioksidan bileşiktir. Prematüre bebeklerde A vitamini depoları ve A vitamini transport taşıyıcı protein, plazma retinol bağlayıcı protein (RBP) düzeyleri düşük olduğu ve bu durumun BPD gelişme riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Darlow ve ark., 2016).

A vitamini uygulaması rutinde intramüsküler olduğu için günlük yaratmaktadır. Oral yoldan verilen A vitamini, zayıf emilim ve düşük retinol-binding protein düzeyleri nedeniyle tavsiye edilmemektedir (Meyer ve Gortner 2014).

Kennedy ve ark. (1997) tarafından, A vitamini desteği verilen prematüre bebeklerde yapılan bir meta analizde BPD'yi % 17 oranında azalttığı ifade edilmiştir.

1.4.6. İnhale Nitrik Oksit

İnhale nitrik oksit, alveoler ve damar gelişim için gereklidir ve yokluğu BPD hastalığına neden olabilmektedir. BPD'nin önlenmesi için inhale nitrik oksit kullanımı birok çalışmaya araştırma konusu olmuştur; ancak, bu çalışmaların sonuçları tutarsızdır.

1.4.7. Diüretikler

BPD tanısı almış erken doğan bebeklerde artan mikrovasküler geçirgenliği takiben gelişen pulmoner ödem nedeniyle erken dönemde diüretik kullanımına başvurulmaktadır.

Postnatal 3 haftadan küçük bebeklerde genel olarak loop diüretiklerinin kullanılmasının, akciğer kompliansı ve direnci üzerine olumsuz etkileri nedeni ile dikkatle kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Tek başına veya spironolakton gibi distal renal tübüller üzerine etki eden bir diüretik ile kombine kullanıldığında, BPD tanısı almış bebeklerde akciğer işlevini düzeltmekte ve furosemid ihtiyacını azaltmaktadır (Thomas ve ark., 2005). İnhalasyon furosemid kullanımı BPD tanısı almış bebeklerde akciğer fonksiyonlarında geçici süreliğine iyileşme sağlamaktadır; ancak, son bulgular bu tedavi şeklini desteklememektedir (Stewart ve Brion 2011). Sistemik diüretiklerin ise, yapay solunum uygulama süresi, oksijen tedavisi ve hastanede yatan BPD tanılı bebekler üzerine yararlı etkilerini destekleyecek bulgular çok az olduğundan rutin kullanımı önerilmemektedir (Stewart ve Brion 2011).

1.4.8. Bronkodilatörler

Bronkodilatörler, bronşiyal düz kaslarda gevşeme sağlayarak havayolu direncini azaltarak akciğer uyumunu arttırmaktadırlar. Tüm bu etkiler solunumda iyileşmeye yol açmakla birlikte, bu ilaçların etkilerinin geçici olduğu ifade edilmiştir (Aubier ve ark., 1981; Sigrist ve ark., 1982) β -agonist olan albuterol ve antikolinergik ilaç olan ipratropium bromür en yaygın kullanılan bronkodilatörlerdir.

İnhalasyon β -agonistler yalnız kullanılabileceği gibi antikolinergiklerle kombine olarak da kullanılabilmektedir. Uzun dönem bronkodilatör kullanımı sonucunda ilacın etkilerinin BPD'nin tedavisinde ve korumasında faydalı olup olmadığına dair yeterli veri olmamakla birlikte, rutin uygulamada inhalasyon ya da sistemik

bronkodilatatörlerin yeri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, ağır akciğer hastalığına doğru bir gidiş söz konusu olduğunda kullanılması önerilmektedir (Thomas ve ark., 2005).

1.4.9. Makrolid Grubu Antibiyotikler

Makrolid grubu antibiyotiklerin antimikrobiyal özellikleri *Ureaplasma urealyticum* bakterisine karşı etkili olduğu saptanmıştır. Bu grup antibiyotikler aynı zamanda güçlü immünomodülatuar özelliğe sahiptirler ve akciğerde proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayabildikleri de ifade edilmiştir. Mabanta ve ark., 2003; Ballard ve ark, 2011; Ozdemir ve ark., 2011).

1.4.10. Yeni Tedaviler

1.4.10.1. İnositol

Endotelial hücre büyümesi üzerinde, glukokortikoid ilişkili akciğer epitel hücre farklılaşmasını arttırmada ve antioksidan benzeri etkileri bulunmaktadır. Bunların yanı sıra surfaktan sentezinde de önemli bir role sahiptir. Hallman ve Epstein (1980) tarafından yapılan araştırmada, tip II pnömositlerde bulunan fosfatidilinositol üretiminin hücre dışı inositol yoğunluğuna bağlı olduğu ve inositol varlığının surfaktan olgunlaşmasını arttırdığı saptanmıştır.

1.4.10.2. Clara Hücre Proteini (rHCC10)

İmmünomodülatuar ve antiinflamatuvar özellikleri olan bir proteindir. Yapılan pekçok sayıdaki hayvan çalışmalarında olumlu etkisi gösterilmiş; ancak, etkinlik ve

güvenirligi için daha kapsamlı klinik çalışmaların devam ettiği bildirilmiştir (Levine ve ark., 2005).

1.4.10.3. Kök Hücre Tedavisi

10 yıldan fazla devam eden preklinik çalışmaların sonucunda, BPD'nin önlenmesi için mezenşimal kök hücre uygulamalarının olumlu yönde ilerlediği açıklanmıştır (Augustine ve ark., 2017). Uygulama zamanı, uygulanan doz ve uygulama yoluna ilişkin tartışmalı çalışmalar olsa da, kök hücrelerin, gelecekte BPD için tek korunma ve tedavi aracı olabilecekleri öne sürülmüştür (Thebaud ve Kourembanas 2017; Mobius ve Thebaud 2017).

1.5. Bronkopulmoner Displazi ve Pulmoner İnflamasyon

Pulmoner inflamasyon, bronkopulmoner displazi patogenezinde anahtar role sahiptir. Bu inflamatuvar süreç çoklu risk faktörleri tarafından indüklenmektedir. Bu durum prematüre bebeklerin pulmoner interstisyel dokularında zararlı bir inflamatuvar yanıtı indüklemektedir. Söz konusu inflamatuvar yanıt, nötrofiller ve makrofajların yanı sıra proinflamatuvar aracılardan da bulunduğu bir kaynak sağlayıcı bölge ile karakterizedir. Bu faktörler arasındaki dengesizlik BPD tanısı alan preterm bebeklerin normal alveolizasyonu ve pulmoner vasküler gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir.

Prenatal enfeksiyonlardan koriyoamniyonit ve postnatal enfeksiyonlardan sepsis, nekrotizan enterokolit gibi durumlar BPD gelişimi için bir risk faktörüdür. BPD gelişen bebeklerde koriyoamniyonit mevcut ise amniyotik sıvıda ve kanda IL-1 β , IL-6, IL8, TNF- α gibi sitokin seviyelerinin yükseldiği saptanmıştır (Muhumuza ve ark., 2004; Thompson ve Bhandari 2008;). Pulmoner ve sistemik enfeksiyonlar, uygun olmayan resüsitasyon, yüksek oksijen maruziyeti, mekanik ventilasyon, koriyoamniyonit öyküsü ve çeşitli postnatal faktörler, prematürelerin immatür hava

yollarında ve dokular arası bölgelerde inflamatuvar yanıtta neden olabilmektedir (Kotecha 2000; Aaltonen ve ark., 2005; Speer 2006).

Koriyoamniyonit varlığında bol miktarda sitokin salınımı ile karşı karşıya kalan akciğerlerde, yapay solunum ya da destek ksijen tedavisi de eklenirse akciğer hasarı, pulmoner inflamatuvar cevap, fibrozis ve sonuçta alveolarizasyon ve kan damar gelişiminin inhibisyonu ile karakterize BPD tablosu meydana gelmektedir. Söz konusu durumun gelişmesinde, inflamatuvar hücreler, endotelial adezyonda artış, RDS olgularında plazma proteinlerinin aktivasyonu ve alveollerin kapiller membranda geçirgenlik artışı, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlikler etkili olmaktadır.

TGF- β normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında interstisyel pulmoner fibrozisli hastalarda 10 kat artmış olmasına rağmen, TNF seviyelerinde değişiklik görülmemiştir (Smith ve ark., 1995)

TNF- α , inflamatuvar cevapta çok yönlü tesirleri olan bir sitokindir. Bağlandığı reseptörlerden bazıları (P55 ve FAS) apoptotik sinyallerin transferinde görevli olanlardır ve TNF- α 'nın FAS reseptörüne bağlanarak apoptozisi başlatmasının, pulmoner fibrozisin oluşumunda önemli bir göreve sahip olduğu ifade edilmiştir (Kuwano ve ark., 1999).

IL-4, fibroblast aktivasyonu için önemli bir sitokindir. Makrofaj ve Th-2 hücreleri tarafından üretilmektedir. IL-4, farklılaşmış Th-2 hücrelerinin büyüüp gelişmesini teşvik ederken aynı zamanda Ig E oluşumuna da katkı sağlamaktadır (Postlethwaite ve ark., 1992).

IL-10, immün faaliyeti değişken oranlarda baskılayabilen bir Th-2 sitokindir. IFN- γ , TNF, IL-12 ve kemokinleri de içeren çok sayıda proinflamatuvar sitokini inhibe etmektedir (Keane ve Strierter 2002).

Lökotrien B₄ (LTB₄) ve IL-8, insanlarda nötrofil tepkimeleri için önemli mediatörlerdir. BPD tanısı almış olan bebeklerin bronkoalveoler lavaj sıvılarında (BAL) saptanmıştır. LTB₄ nötrofil ve akciğerlerin makrofajlarında üretilmektedir. Enfeksiyon var olmayan durumda, doğumdan sonra ilk 15 günde akciğer salgısında LTB₄ seviyesi genellikle düşüktür; ancak, BPD riski olan vakalarda, belirgin bir şekilde yüksek seyrettiği bildirilmiştir (Stenmark ve Voelkel 1988).

IL-8, akciğerlerdeki inflamatuvar belirteçlerinden biridir. Hiperoksi ve hipoksi tarafından uyarılan akciğerde nötrofil birikmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. IL-8 düzeyi, BPD riski olan bebeklerde yüksek seviyededir ve trakeobronşiyoler aspirat sıvısında (TBAF) plazmadan 200 kat daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Groneck ve ark., 1994). Bu artmış seviyelerin, BPD gelişimi için bir belirteç olduğu açıklanmıştır (Groneck ve Speer 1995).

Prenatal inflamasyon ve enfeksiyonlar, BPD gelişiminde en önemli patofizyolojik mekanizmalar arasındadır. Ventile edilen prematüre bebeklerin havayolunda birçok proinflamatuvar ve kemotaktik faktörün varlığı tespit edilmiş ve BPD gelişen bebeklerin solunum yollarında bu faktörler yüksek seviyede saptanmıştır. IL-8 gibi faktörlerin solunum yollarında devamlı olarak bulunması, IL-10 gibi düzenleyici faktörlerin seviyesinin azalması inflamasyonun devam etmesine sebebiyet vermektedir. Yapılan bir araştırmada, antenatal dönemde meydana gelen enfeksiyon veya inflamasyon ile *Ureaplasma urealyticum* isimli bakterinin varlığı fetal kolonizasyonun, doğum sırasında bebeklerin solunum yollarının inflamatuvar faktörlere maruz kalmalarına neden olduğu bildirilmiştir (Yoder ve ark., 2003).

Respiratuvar distres sendromu sonrası BPD gelişen olguların havayolu salgılarında inflamasyon gelişiminde rolü olan birçok madde üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, Anafilatoxin C5a, lökotrien B₄, TNF- α , IL-8, platelet aktive edici faktör, intersellüler adezyon molekülü-1, fibronektin gibi kemotaktik ve kemokinetik faktörlerin seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır (Groneck ve ark., 1994). TNF- α , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlere bağlı oluşan bağışık cevap, BPD oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen

mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un, akciğer inflamasyonu olan bebeklerde yeterli seviyede bulunmadığı da yapılan bir araştırmada açıkça ifade edilmiştir (De Dooy ve ark., 2001). IL-6 ve IL-8 seviye artışının, BPD gelişen bebeklerde havayolu salgılarında nötrofil birikiminin hemen öncesinde geliştiği gösterilmiştir (Munshi ve ark., 1997).

Akciğer inflamasyonunda, nötrofiller ve makrofajlar kritik rol oynamaktadır. Kronik akciğer hasarı gelişen bebeklerin havayolu sekresyonlarında inflamatuvar hücre olarak yaşamın ilk haftasında nötrofiller ön planda iken, sonra alveolar makrofajlar ön plana çıkmaktadır (Li ve Tullus 2002). İnflamasyon sürecinde aktive hale gelen nötrofiller pulmoner vasküler sistem endoteline yapışmakta ve böylece hasar verici süreç başlamaktadır. Nötrofillerin apoptozu uygun şekilde gerçekleşemez ise, nötrofillerin yaşam süresi uzamakta, uzun ömürlü neonatal nötrofiller ise pulmoner enflamasyonda artışa sebebiyet vermektedir. Nötrofillerin apoptozu Fas Reseptörlerine (FasR) bağlanan endojen Fas ligand tarafından tetiklenmektedir. Yenidoğanların Fas reseptörleri az miktarda olduğundan, neonatal nötrofillerin yaşam süresi uzundur (Speer 2001).

Nötrofillerin yanı sıra, inflamasyonda, alveolar ve pulmoner makrofajlar da BPD'nin tüm evrelerinde önemli role sahiptirler. Sitokin salınımı ile karşılaşan akciğerde, pulmoner inflamatuvar yanıt sonrası fibrozis, alveolarizasyon ve vasküler gelişimin inhibisyonu ile BPD oluşmaktadır (Speer 2001).

CD68 pozitif makrofajlar, RDS'nin erken evrelerinde ölen preterm bebeklerin akciğer dokularında yüksek seviyede tespit edilmiştir (Koenig ve ark., 2005). Bunun dışında, BPD tanısı alan bebeklerde IL-8 seviyesinin yüksek oranda saptandığı açıklanmıştır. IL-8 sitokini en önemli faktörlerden biri gibi gözükse de, BPD için spesifik bir belirteç değildir. Monosit kemoatraktan proteinler (MCP-1, MCP-2 ve MCP-3) ve makrofaj inflamatuvar proteinler (MIP-1 α , MIP-1 β) de BPD ile ilişkili olduğu saptanan; ancak, BPD'ye spesifik olmayan diğer kemokinlerdir (Bose ve ark., 2008).

Lökotrien B4 ve anafolatoksin C5a yolakları da akciğer hasarında rol oynamaktadır (Groneck ve ark., 1994; Kotecha ve ark., 1998). Akciğerlerdeki inflamatuvar hücreler, kapiller damar duvarından hava boşluğuna ya da dokular arası ekstraselüler matrikse göç ederler. Bu yolakta görevli adezyon molekülleri olan selektinler, integrinler ve immunglobulinler, akciğerde parankimal hasarlanmaya neden olarak BPD gelişiminde rol almaktadır (Groneck ve ark., 1994).

Bir başka antiinflamatuvar sitokin ise, clara hücre proteini (CC10)'dir. CC10 inflamatuvar hücre kemotaksisini ve fibronektin bağlanmasını ve surfaktanın fosfolipit komponenti olan fosfolipaz A2 sekresyonunu inhibe ederek etki göstermektedir (Levine ve ark., 2005).

Sonuç olarak, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik BPD gelişiminde önemli yer tutmaktadır (Kotecha ve ark., 1995). BPD gelişen bebeklerin hava yolu sekresyonlarında anafilatoksin C5a, LTB4, TNF- α , IL-8, platelet aktive edici faktör, intraselüler adezyon molekülü, fibronektin, elastin yıkım ürünleri gibi faktörl seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Groneck ve ark., 1994).

1.6. Pulmoner İnflamasyonu Tetikleyen Faktörler

1.6.1. Mekanik Ventilasyon

Özellikle prematüre bebeklere uygulanan mekanik ventilasyonun zararlı etkileri olabilmektedir. Preterm hayvanlarda yapılan bir araştırmada, mekanik ventilasyonun başlatılmasının, akciğerlerin aşırı gerilmesine, yapısal elemanların bozulmasına ve lökositler ile birlikte boşalan proinflamatuvar proteinlerin salınımına neden olduğu ifade edilmiştir (Muscedere ve ark., 1994; May ve ark., 2004).

1.6.2. Hiperoksi

Preterm ve term doğan hayvanlarda yapılan araştırmalarda, pulmoner inflamasyona neden olan aracılardan hiperoksi ortamında daha güçlü ve bağımsız indüklendikleri saptanmıştır (Rozycki ve ark., 2002; Wagenaar ve ark. 2004).

Bir araştırmaya göre, prematüre babunlar, neonatal fareler ve sıçanlarda hiperoksiye maruz kalmanın, BPD'yi andıran kronik bir akciğer hastalığına neden olduğu gösterilmiştir (Bonikos ve ark., 1975; Roberts ve ark., 1983; Warner ve ark., 1998). Bir diğeri araştırmada ise, preterm ve term tavşanlardan elde edilen makrofajlar, bir gece boyunca % 95 oranında oksijenli ortamda inkübe edildiğinde, sadece preterm makrofajları, IL-1 ve IL-8 mRNA ekspresyonunda ve hücre içi oksijen radikal içeriğinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır (Rozycki ve ark., 2002).

1.6.3. Koriyoamniyonitis

Bu inflamasyon etkenine maruz kalan fetüslerin akciğer dokusunda hasarlı hücrelerin ve IL-8 mRNA'nın ekspresyonunun belirgin bir ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir (Schmidt ve ark., 2001; May ve ark., 2004). Ayrıca, Koriyoamniyonit sırasında proinflamatuvar sitokinlere ve diğeri intrauterin araçılara maruziyetin, fetüslerde sayıca artan apoptotik hava yolu hücrelerinin oluşumuna neden olduğu açıklanmıştır (May ve ark., 2004).

Her ne kadar fetal yanıtın BPD riskini arttırdığı mekanizmalar tam olarak anlaşılammış olsa da, pulmoner inflamasyonun erken intrauterin olarak başlaması, BPD'nin patogenezinde önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. Koriyoamniyonitis'de mekanik ventilasyon ve postnatal sepsis, BPD modülatörleri olarak tanımlanmıştır (Van Marter ve ark., 2002; May ve ark., 2004).

1.6.4. Enfeksiyon

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde erken başlangıçlı sistemik bakteriyel enfeksiyonlar ile BPD gelişimi arasındaki ilişki kanıtlanmıştır (Groneck ve ark., 1996; Shimotake ve ark., 2004). Ayrıca, hastane kaynaklı enfeksiyonlar BPD için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Rojas ve ark., 1995; Groneck ve ark., 1996). Sistemik enfeksiyonların ve zararlı aracı moleküllerin, endotelyal pulmoner ve bronkoalveolar hücreler üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra, kalıcı bir pulmoner damar hasarı hastalığı ve ilgili bölgede gerçekleşen hemodinamik değişikliklerin, BPD gelişiminde önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (Bancalari ve ark., 2005).

1.7. Sitokinler

Sitokinler, hücrelerarası sinyal ileten, peptid veya glikoprotein yapısında mediyatörlerdir. Makrofajlar, monositler, lenfositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler gibi pek çok farklı hücre grupları tarafından oluşan, immun ve inflamatuvar süreçlere katılan hücrelerin aktivitelerini arttırmaktadırlar (Durum ve Openheim 1993; Bellanti ve ark., 1994). Bu sitokinlerin her birinin tüm hücreler üzerinde yüksek afinite ile bağlandıkları spesifik reseptörleri bulunmaktadır. Sitokinler kendilerine özgü reseptörlerine bağlandıktan sonra, ilgili reseptörde yapısal değişiklik meydana getirmekte, mRNA transkripsiyonu ve yeni protein sentezi meydana gelmektedir (Kılıçturgay 1994).

Yoon ve ark. (1997) tarafından yapılan araştırmada, amniyotik sıvıda IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 seviyesi yüksek olan annelerden doğan prematüre bebeklerde daha fazla oranda BPD geliştiği bildirilmiş olup, bu durum BPD'nin intrauterin dönemde başladığının göstergesidir.

1.7.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

Tümör nekrozis faktör (TNF), hem fizyolojik hem de patolojik süreçlere katkıda bulunan kritik bir sitokindir. Normal fizyolojisi, akut ve kronik inflamasyon, otoimmün hastalık ve kansere bağlı inflamasyondaki rollerini içermektedir (Chu 2013). TNF ailesi; TNF- α , TNF- β , CD40 ligandı (CD40L), Fas ligandı (FasL), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), ve LIGHT (TNFSF14) proteini gibi fizyolojik süreçler, sistematik inflamasyon, tümör lizisi, apoptoz ve akut faz reaksiyonlarının başlangıcında yer alan en önemli sitokinlerden oluşmaktadır (Chu 2013). TNF- α , esas olarak makrofajlar tarafından üretilirken, TNF- β , T lenfositleri tarafından üretilmektedir (Chu 2013).

TNF- α , direkt olarak kemotaktik olmasa da, lökositler ile vasküler endotelial hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyararak lökositlerin içe akımına göç etmelerine neden olmaktadır (Yoon ve ark., 1997). Bu bulgu BPD gelişen bebeklerin bronkoalveolar sıvılarında da saptanmıştır (Kotecha ve ark., 1998). İnflamatuar yanıtın erken döneminde tespit edilen TNF- α 'nın, kötü pulmoner sonuçlara sahip prematüre bebeklerin trakeal aspirasyon sıvı örneklerinde arttığı bildirilmiştir (Mahieu ve ark., 2005).

1.7.2. İnterlökin-1 (IL-4)

IL-4, birçok hücre tipi üzerinde pleiotropik etkileri olan 15-kD'lik bir polipeptittir. IL-4, makrofajların yanı sıra, Th-2 hücreleri tarafından da üretilmektedir. Th-2 hücrelerinin dönüşümünü ve antikor yanıtın meydana gelmesi ile sonuçlanan farklılaşmış Th-2 hücre büyümesini teşvik etmektedir. Ayrıca, IgM'den IgG1 ve IgE'ye sınıf geçişini desteklemektedir (Choi ve Reiser 1998).

Yapılan bir araştırmada, IL-4 sitokinden yoksun fareler, vahşi tip farelere kıyasla zayıflatılmış hava yolları inflamasyonu geliştiği açıklanmıştır (Choi ve Reiser 1998).

Mcguirk ve Mills (2000) tarafından yapılan araştırmada da, IL-4'ün, antijen taşıyan patojen ile enfeksiyonu takiben inflamatuvar yanıt üzerinde büyük bir düzenleyici etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir.

1.7.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, inflamasyon, immün yanıt üzerinde pleiotropik etkiye sahip bir aracı moleküldür. En önemli kaynağını mononükleer fagositik hücreler oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra, fibroblastlar, endotel hücreleri, B ve T lenfositler gibi hücreler tarafından da sentez edilmektedir (Tanaka ve ark., 2014)

IL-1 ve TNF- α doğrudan IL-6 proteinine etki ederek IL-6 sentezini artırmaktadır (Tanaka ve ark., 2014). Bunların dışında, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, interferon-beta gibi sitokinler, antijenler ve bakteriyel endotoksinlerin de farklı hücre tiplerinde IL-6 oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2014).

IL-6'nın RDS ve BPD tanısı olan bebeklerin trakeal aspirasyon sıvısında yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. IL-6, BPD tanısı alan prematüre bebeklerin trakeal aspirasyon sıvısında yaşamın birinci günü kadar kısa sürede tespit edilen bir sitokindir (Bagchi ve ark., 1994). Amniyotik sıvıda da tespit edilen IL-6'nın, intrauterin enfeksiyona karşı olan konak yanıtının yansıması olduğu, preterm doğum eylemi olan hastaların amniyotik sıvılarındaki IL-6 konsantrasyonunun belirlenmesinin koriyoamniyonitin şiddetinin saptanmasında ve erken tanısında klinik değer taşıdığı kanıtlanmıştır (Tsudave ark., 1998).

1.7.4. İnterlökin-8 (IL-8)

Temel etkisini nötrofiller üzerinde göstermektedir. Nötrofiller ve daha az oranda lenfositler, eozinofiller ve bazofiller için aktive edici ve kemotaktik bir mediyatördür. TNF ve IL-1 sitokinlerinin başlattığı nötrofil aktivasyonu, büyük

oranda bu sitokinler ile stimüle olan IL-8 ve ilişkili proteinlerin sekresyonuna bağlıdır. Bundan dolayı, IL-8, inflamasyonun en önemli sekonder mediyatörü olarak görev almaktadır (Akyol 1994)

IL-8, akciğerlerdeki inflamatuvar belirteçlerinden biridir. Hiperoksi ve hipoksi tarafından uyarılan akciğerde nötrofil birikmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. BPD riski olan bebeklerde yüksek seviyede olduğu ve trakeobronşiyoler aspirasyon sıvısında (TBAF) plazmadan 200 kat daha yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir (Groneck ve ark., 1994). Bronkoalveolar lavaj sıvısında (BAL) artmış konsantrasyonu BPD gelişimi için belirteçtir (Groneck ve Speer 1995).

1.7.5. İnterlökin-10 (IL-10)

Lenfoid ve myeloid gibi kök hücrelerin regülasyonunda rolü olan antiinflamatuvar ve immünoregülatuar bir sitokindir. T ve B lenfositleri, monositler, makrofajlar tarafından üretilmektedir (Akyol 1994). IL-10 direkt olarak T, B ve mast hücrelerinin fonksiyonu ve gelişmesini etkilemektedir. IL-10, sentez inhibitör faktörü olarak da bilinmektedir. Sitotoksik, inflamatuvar antikor yanıtlarının arttırılması ile ilişkili çeşitli görevleri bulunmaktadır. Aktif B hücrelerinin çoğalmasını arttırmakta, böylelikle IgG, IgA, IgM sentezinin artışına da katkıda bulunmaktadır. Bunun dışında plazma hücrelerinde farklılaşma meydana getirebilmektedir (Mukaida ve ark., 1995).

Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un, akciğer inflamasyonu olan bebeklerde yeterli düzeyde bulunmadığı da yapılan bir araştırmada açıkça ifade edilmiştir (De Dooy ve ark., 2001). Doğumdan sonra, kandaki proinflamatuvar sitokin IL-6, kordon kanında glikoprotein 130 (gp130) seviyesinin yüksek bulunması, ve plasentada IL-10 ekspresyonundaki azalmanın BPD ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Ambalavanan ve ark.2009; Kaukola ve ark., 2009; McGowan ve ark., 2009).

1.7.6. Nükleer Faktör Kappa B (Nf-κB)

Nükleer Faktör kappa B (Nf-κB), immüoglobulinin kappa hafif zincirine bağlanan B hücrelerinin çekirdeğinde bir faktör olarak tanımlanmış, tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. İnflamasyon, hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesi gibi fonksiyonları, birçok hastalığın anlaşılmasının temelini oluşturmaktadır (Serasanambati ve Chilakapati 2016).

Nf-κB hakkında akciğer gelişimi ya da BPD ile ilişkilendirilen klinik bilgi ve veri sınırlıdır. Bir araştırmada, BPD gelişen prematüre bebeklerin trakeal aspirasyon sıvısında Nf-κB aktivitesinin arttığı gözlemlenmiş, bu durum Nf-κB'nin BPD patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Alvira 2014).

1.7.7. Proinflamatuvar Sitokin Yanıtı

Farklı hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan sitokinler, inflamasyon, hücre büyümesi ve iyileşmesi, hasara karşı sistemik yanıt oluşturma, immün ve inflamatuvar yanıtı düzenleyen mediyatörlerdir. Sitokinler, glukoprotein yapısında olup, lenfosit, monosit ve makrofajlardan sentez edilmektedirler (Kershaw ve ark. 2004). Sitokinlerin etkilerine göre sınıflandırılması Çizelge 1.3. de gösterilmiştir.

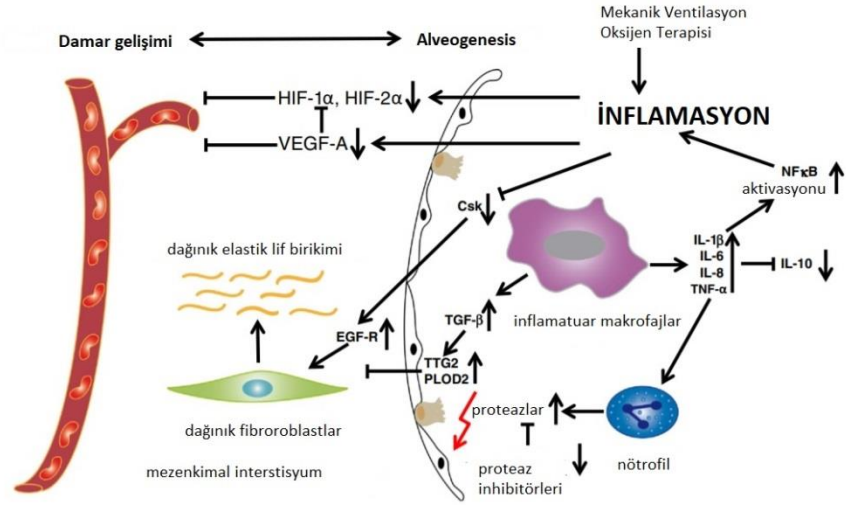
Çizelge 1.3. Sitokinlerin etkilerine göre sınıflandırılması

Nonspesifik immüniteyi ve enflamasyonu arttıran pro inflamatuvar sitokinler	Lenfosit aktivasyonu büyüme ve farklılaşmasında görev alan spesifik immünite mediyatörleri	Kemik iliği prekürsörlerinin koloni stimülasyonu yapanlar	Regülatör sitokinler	Kemokinler
IL-1	IL-2	G-CSF	IL-10	IL-8
IL-6	IL-4	GM-CSF	TGF- β	Rantes (CCL5)
IL-8	IL-5			MCP-1
IL- α	IL-12			MCP-2
TNF	IL-13			MCP-3
İnterferon- γ (IFN- γ)	IL-14			Eotaksin
	IL-15			MIP-1 α
	IL-16			MIP-1 β

Proinflamatuvar sitokinlerden IL-8, nötrofillerin göçü için ana kemotaktik faktör iken, akut faz cevabı olarak IL-1 β ve IL-6 aktif rol oynamaktadır. BPD gelişen bebeklerin trakeal aspiratuvar sıvısında proinflamatuvar sitokin seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Thompson ve Bhandari 2008).

Antiinflamatuvar sitokinler ise, B hücrelerinin ve makrofajların üretilmesinden, farklılaşmasından ve proliferasyonundan sorumludur (Mukaida ve ark., 1995)

BPD gelişimine neden olabilecek nihai inflamatuvar mediyatörlerin kesin işlevleri hala tartışma konusu olmakla birlikte bilinen inflamasyonun kritik aşamaları, pulmoner inflamatuvar yanıtın alveoler ve vasküler gelişim ve mezenkimal interstisyumdaki akciğer gelişiminin merkezi bileşenleri üzerindeki etkileri şekil 1.3.'te özetlenmiştir.



Şekil 1.3. Pulmoner inflammatuar yanıtın prematüre akciğer üzerindeki etkisi (Shahzad ve ark., 2016).

Görüldüğü üzere, doğum öncesi inflamasyon, doğrudan akciğerlerde hücre hasarı oluşturarak, akciğer damar gelişimine olumsuz yönde etki ederek ve akciğerdeki immun hücrelerin aktivasyonuna neden olarak inflammatuar yanıtı artırmaktadır. Perinatal ve postnatal dönemdeki inflamasyon da aynı etkiye neden olmaktadır. Bunların dışına, erken doğum, enfeksiyonlar, mekanik ventilasyon, cinsiyet farklılığı, genetik eğilim ve oksijen tedavisinin neden olduğu patolojik süreçler de BPD gelişimi ile ilişkilidir.

Elde edilen veriler, BPD'nin sadece çok faktörlü değil, aynı zamanda oldukça karmaşık etkenlerin meydana getirdiği bir hastalık olduğunu doğrulamaktadır. Sinyal iletimi ve yolların etkileşimlerinin tam olarak değerlendirilmesi, hastalık patolojisinin tam olarak anlaşılmasına ileriki süreçte katkıda bulunacaktır.

1.7.8. Matriks Metalloproteinazlar

Çinko bağımlı endopeptidaz ailesinin üyesi olan matriks metalloproteinazlar, substrat spesifitesine ve yapısal özelliklerine göre birkaç alt sınıfta değerlendirilmektedir. MMP-2 ve MMP-9, inflammatuar akciğer hasarı ile ilişkili

jelatinazlardır. Jelatinazlar, hücre dışı matrisin proteinlerine hasar vermekte, damar oluşumunu indüklemekte, hücre göçünü arttırmakta, proinflamatuvar sitokinleri aktive etmekte ya da etkisiz hale getirmekte, yeni damar oluşumunu değiştirmekte, inflamatuvar hücrelerin göçünü arttırmakta, böylelikle akciğer dokusunun yeniden şekillenmesine neden olmaktadır.

MMP-9, kemik iliğinde nötrofil ve eozinofil granüllerinde sentezlenmekte ve depolanmaktadır. IL-1 β , makrofajlar, Clara hücreleri, alveolar tip II hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve bronşiyal epitel hücreleri de MMP-9 üretimini indüklemektedirler.

Akciğerlerde artan MMP-9 aktivitesinin, yenidoğan bebeklerde ve hayvan modellerinde BPD gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Speer 2006).

1.8. Yeni Adipositokinlerin ve Diğer Proinflamatuvar Sitokinlerin Bronkopulmoner Displazi Üzerindeki İnflamatuvar Etkileri

Bebekleri BPD'ye yatkın hale getiren başlıca risk faktörleri arasında prematürite, fetal büyüme kısıtlaması ve akciğer iltihabı bulunmaktadır (Speer 2006; Fanaroff ve ark. 2007; Bose ve ark., 2009)

BPD tanılı bebeklerde olgunlaşmamış akciğer dokusunda meydana gelen inflamatuvar sürecin normal alveoler gelişim sürecine müdahale ettiği ve meydana gelen hasarlı alveolarizasyonun kaçınılmaz olduğu saptanmış, bu durumun BPD'de görülen en tipik bulguyu açıkladığı ileri sürülmüştür (Coalson 2006; Fanaroff ve ark. 2007). BPD gelişen bebeklerin kan, kordon kanı ve amniyotik sıvısında yüksek seviyelerde sitokin gözlemlendiği açıklanmıştır (Ambalavanan ark.2009).

Doğumdan sonra, kandaki proinflamatuvar sitokin IL-6 ve kordon kanında glikoprotein 130 (gp130) seviyesinin yüksek bulunması, ayrıca plasentada IL-10

ekspresyonunun azalmasının BPD ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Ambalavanan ve ark.2009; Kaukola ve ark., 2009; McGowan ve ark., 2009).

Adipokinler, yağ dokusu tarafından salgılanan protein aracı maddelerdir ve sadece enerji metabolizmasının düzenlenmesinde değil, aynı zamanda birçok kronik inflamatuvar yanıt gelişiminde de rol oynamaktadırlar (Fantuzzi 2005; Ouchi ve ark., 2011).

Adipokinler, genel olarak adipositlerden sentezlenen, hücreden hücreye sinyal iletiminden sorumlu proteinleri tanımlamak için kullanılan bir tanımdır (Kershaw ve ark. 2004). Adipoz doku, trigliseridlerin enerji deposu olarak bulundurulduğu esas bölgedir.

Sitokinler, kendilerini uyaran hücrelerden oldukça kısa bir sürede salgıyanlar; ancak, depolanmazlar. Genellikle kısa mesafelerde ve kısa zaman aralıklarında ve çok düşük seviyede hareket etmektedirler. Davranışlarını değiştirmek için ikinci ulaklar ile spesifik membran reseptörlerine bağlanarak hareket etmektedirler. Sitokinlere verilen yanıtlar, membran proteinlerinin düzeylerinin artması ya da azalması aynı zamanda efektör moleküllerin salınmasını içermektedir.

1.8.1. Nesfatin-1

Nesfatin-1, ilk kez 2006 yılında Oh-I ve ark (2006) tarafından keşfedilmiştir. Yapılan çalışmada, nesfatinin, hipotalamusun iştah kontrolünden sorumlu çekirdeklerinden salgılandığı gösterilmiştir. Beynin hipotalamus bölgesi, beslenme davranışlarını düzenleyen önemli bölgeler ile bu bölgelerden salgılanan molekülleri içermektedir. Nesfatin-1 besin alımının düzenlenmesinde görevli olan, salgılanması açlık sırasında azalan, hipotalamus ve beyin sapından salgılanan bir peptiddir (Oh-I ve ark., 2006). Aynı çalışmada leptin geninin mutant olduğu obez farelerde de nesfatin-1'in yiyecek alımını baskıladığı bildirilmiştir (Oh-I ve Shimizu 2006).

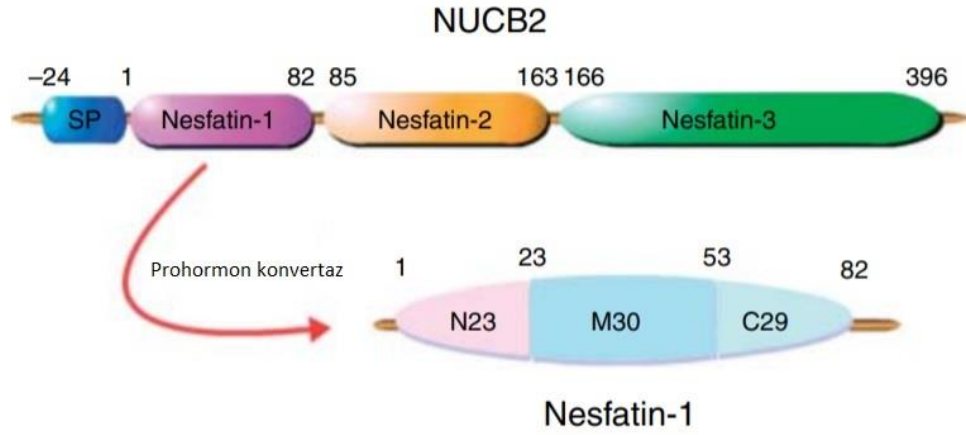
Oh-I ve ark (2006), nesfatin-1'in sadece beslenme düzenlenmesinde değil, diğer fizyolojik fonksiyonlarda da rolünü açıklamayı başarmıştır.

1.8.1.1. Genetik Yapısı

Nesfatin-1, nukleobindin 2 (NUCB2), hipotalamusta sentezlenen bir proteindir (Oh-I ve ark., 2006). NUCB2'nin merkezi sinir sistemi dışında, esas olarak mide mukozasında ve beyaz yağ dokusunda, ayrıca az miktarda periferde, özellikle adipoz doku, pankreatik endokrin beta hücreleri ve testis dokularında salgılandığı da gösterilmiştir (Gonzalez ve ark. 2009, Shimizu ve ark. 2009b, Stengel ve ark. 2009, Ramanjaneya ve ark. 2010, Kim ve ark. 2014). Nesfatinin periferik dokularda salgılandıktan sonra kan beyin bariyerini geçebildiği tespit edilmiştir (Gonzalez ve ark., 2009; Stengel ve ark. 2009).

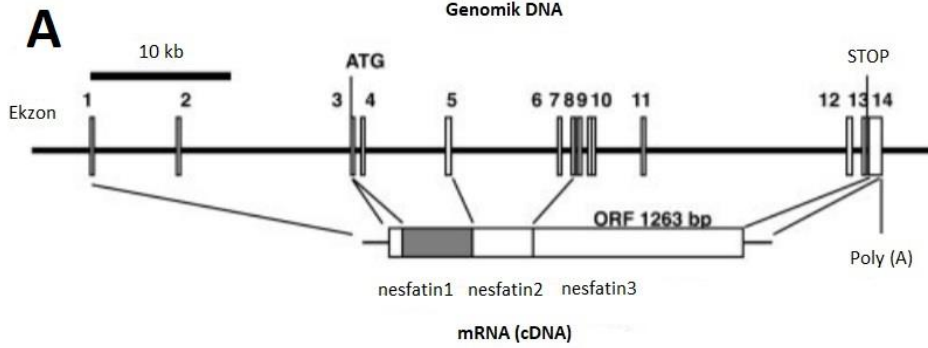
Nesfatin-1, 82 aminoasit'ten oluşan bir polipeptid olup kalsiyum ve DNA bağlayan protein olan NUCB2'den eksprese olmaktadır (Gonzalez ve ark., 2009).

NUCB2 posttranslasyonel modifikasyonlar için birçok bölgeye sahiptir. NUCB2'nin özel prohormon dönüştürücü enzimler ile (PC3/1 ve PC2) posttranslasyonel modifikasyonları sonucunda; Nesfatin-1 (1-82. aminoasitleri arasından), Nesfatin-2 (85-163. aminoasitleri arasından) ve Nesfatin-3 (166- 396. aminoasitleri arasından) meydana gelmektedir (Şekil 1.4.) (García-Galiano ve ark., 2010, Palazs vd 2012).



Şekil 1.4. NUCB2 proteininin primer yapısı ve Nesfatin-1 molekülünün şematik gösterimi. NUCB2, öncesinde 24-aminoasit sinyal peptidi ile 396 amino asitten oluşmaktadır. Birincil sekansında bulunan prohormon konvertazları için konsensüs klevaj bölgelerine dayanarak, üç ana peptit ürününün NUCB2'den türetileceği tahmin edilmektedir: Nesfatin-1 (kalıntı 1-82), nesfatin-2 (kalıntı 85-163) ve nesfatin-3 (kalıntılar 166-396). Özellikle nesfatin-1, PC3/1 ve PC2'nin uyumlu eylemleri tarafından serbest bırakılmış gibi görünmektedir. Nesfatin-1 molekülünün üç potansiyel parçasının fonksiyonel analizinde, nesfatin-1 molekülü (N-terminali (N23),C-terminali (C29), ve merkezi fragmanlar (M30)), nesfatin-1'in anorektik etkileri için aktif bölge içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, bugüne kadar nesfatin-1'in bu tür M30 fragmanının aslında merkezi veya periferik dokularda endojen olarak üretildiğine dair hiçbir kanıt sunulmamıştır. SP, sinyal peptidi. (García-Galiano ve ark., 2010a).

İnsan NUCB2 geni 55 kb uzunluğunda olup 14 ekzon ve 13 intron bölgesine sahiptir (Şekil 1.5.(A)). NUCB2 translasyon bölgesi ve olası sinyal dizisi ekzon-3 bölgesi içinde tanımlanmıştır. Nesfatin-1, NUCB2 geninin ekzon-3 ila ekzon-5 arasındaki bölgesinde kodlanmaktadır. Diğer kodlanan diziler ise ekzon-5 ila ekzon-14 arasında yer almaktadırlar (Yamada ve ark., 2010, Palazs ve ark., 2012). 3'UTR (untranslated region-çevrilmemiş bölge) ekzon-14 içinde tanımlanmıştır. İnsan hipotalamusunda 3-RACE (Rapid amplification of cDNA ends) ürünlerinin dizi analizleri sonucunda, fonksiyonel çoklu adenillenmiş sinyal (AATAAA) dizilerinin, dur kodununun 420 bp gerisinde olduğu ve bu sinyal bölgesinin 22 bp gerisinde ise çoklu adenillenmiş bölgenin bulunduğu saptanmıştır (Şekil 1.5.(A)). Dur kodon arkasında 3'UTR bölgesi içinde ise mRNA stabilizasyonundan sorumlu olabileceği düşünülen dört adet ARE (Adenylate/uridylylate-rich element; Adenilat/uridilat bakımından zengin element) bölgesi bulunmaktadır (Şekil 1.5.(B) (Yamada ve ark., 2010).



B

Ekzon 14

acagACATTTAAAGTCTGAAGTCCACCAGAAGCTTGGGAAGAAAGCTGTTA
 H I *

ACTCAACATCTATTTTCATCTTTTTAGCTCCCTTCCTTTTTCTCTGCTCAAT

+1597 AAATATTTTAAAAGCATATTTGAAATAAAGGGAGATACTTTTTAAATGAA
 AACACTTTTTTTGGGACACAGATATTAAGGATTGAAGTTTATCAGAACC

+1697 AGGAAGAAAACAACTCACTGTCTGCTCTCTGCTCTCACATTCACACG
 TGCTCTTTTATTTAATTTTTTTGTTCTCCTTTAATGATTTAATTAAGTGGCTT

+1797 ATGCCATAATTTAGTGAAACTATTAGGAACTATTTAAGTGAGAAAATC
 TGCCTCTTGCTTTTAAATTAGATTGCTCTCACTTACTCGTAAACATAGGTA

+1897 TTCTTTTATGGGTGCTTATCATTCTTTTCAATAAATGTCTGTTTGATAT
 TAACAATT

Şekil 1.5. (A) İnsan NUCB2 geninin şematik gösterimi ve (B) 3'UTR'nin dizisi. (Yamada ve ark., 2010). (A) Kutular eksonları gösterirken, ince çizgiler intronları göstermektedir; ATG translasyonel başlangıç bölgesini temsil etmektedir. STOP durdur kodonu; poli (A) poliadenilasyon sinyali; ORF, açık okuma çerçevesi. (B) 3'UTR'deki ARE dizilerinin altı çift çizilidir. Poliadenilasyon sinyallerinin (AATAAA) altı çizilmiştir.

1.8.1.2. Nesfatin-1 (NUCB2) Sinyal İletimi

Varsayılan Nesfatin-1 /NUCB2 reseptörü henüz tanımlanmamış olmasına rağmen hem santral sinir sistemi, hem de periferik organlarda nesfatin-1 için spesifik bağlanma yerleri tespit edilmiştir (Ishida ve ark., 2012, Prinz ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda, nesfatin-1'in sadece belirli hücre tiplerinde değil, aynı zamanda pankreatik β hücrelerinde ve kalp miyositlerinde de hücre içi sinyal olaylarını arttırdığı saptanmıştır. Çoğu hücre tipinde, nesfatin-1'in, L-tipi, P/Q tipi veya N-tipi Ca^{2+} kanalları aracılığı ile Ca^{2+} akışını uyardığı ifade edilmiştir (Brailoiu ve ark., 2007, Nakata ve ark., 2011, Ishida ve ark., 2012; Brailoiu ve ark., 2013; Ozcan ve ark., 2016).

Ishida ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan araştırmada, Nesfatin-1'in, siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunda herhangi bir artışa neden olmadığı belirtilmiştir. Bir nöroblastom hücre hattında yapılan *in vitro* çalışmada, cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein (CREB) fosforilasyonunu arttırdığı ifade edilmiştir (Ishida ve ark., 2012; Tanida ve ark., 2015).

1.8.1.3 Nesfatin-1'in Fizyolojik Etkileri

1.8.1.3.1 Gıda Alımının Düzenlenmesinde Etkileri

Nesfatin-1'in besin alımını nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak bilinmemekle birlikte konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Sıçanlarda yapılan bir araştırmada, sıçanların farklı beyin bölgelerine yapılan nesfatin-1 enjeksiyonu ile, nesfatin-1'in besin alımını inhibe edici etkisinin olası mekanizmaları açıklanmaya çalışılmış, nesfatin-1'in leptin reseptörlerinin mutant olduğu sıçanlarda beyine enjekte edilmesi ile besin alımının baskılandığı bildirilmiştir (Cowley ve Grove 2006; Oh-I ve Shimizu 2006; García-Galiano ve ark., 2010; Stengel ve Taché 2010).

Böylelikle, nesfatin-1'in leptin'den bağımsız olarak melatonin sistemini aktive etmesinin anlaşılması, besin alımının inhibisyonunda nasıl bir rol oynadığını açıklayan birinci mekanizmayı oluşturmaktadır (Cowley ve Grove 2006, García-Galiano ve ark., 2010).

1.8.1.3.2. Gastrointestinal Fonksiyonlar Üzerindeki Etkileri

Nesfatin-1/NUCB2 gastrointestinal fonksiyonların düzenleyicisi olarak da etkiye sahiptir. Mide boşalmasını yavaşlatarak ve periferde tokluk sinyallerini ortaya çıkararak nesfatin-1'in merkezi sinir anoreksijenik eylemlerini desteklemektedir. Nesfatin-1'in gastrointestinal fonksiyonlar üzerindeki etkilerinden sorumlu olduğu düşünülen beyin bölgeleri paraventriküler nükleus, arkuat nükleus, santral ve basomedial amigdaladır. Nesfatin-1'in doza bağlı olarak, oksitosinerjik nöronların aracılık ettiği bir etki olan mide hareketliliğini ve boşalmasını azalttığı saptanmıştır (Guo ve ark., 2015). Bir diğer araştırmaya göre, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir sisteminde Nesfatin-1/NUCB2 nöronları arasında nöronal bir bağlantının varlığı da desteklenmiştir (Bonnet ve ark., 2013).

1.8.1.3.3. Glukoz Homeostazındaki Etkileri

Nesfatin-1/NUCB2, kemirgenlerde, köpeklerde, domuzlarda ve insanlarda insülin ile pankreasın kolonize olduğu endokrin adacıklarında da tespit edilmiştir (Stengel ve ark., 2009; Foo ve ark., 2010; Riva ve ark., 2011; Morton ve ark., 2018). Pankreas β hücrelerinde, NUCB2 mRNA ve/veya NUCB2/nesfatin-1 protein sentezi veya salımının, glikoz seviyeleri ile düzenlendiği ifade edilmiştir (Foo ve ark., 2010).

Yapılan bir araştırmada, streptozotosin ile indüklenen diyabetik farelerde, NUCB2 mRNA ve NUCB2/nesfatin-1 protein ekspresyonunun pankreatik adacıklarda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Gonzales ve ark., 2011). Bu sonuç, Tip 2 diyabet modeli olan Goto-Kakizaki sıçanlarının adacıklarında

doğrulanmış, diyetle indüklenen obezite ve sonuç olarak tip 2 diyabetli farelerde bunun tersi gözlenmiştir (Gonzalez ve ark. 2011b). Riva ve ark. (2011) tarafından yapılan araştırmada, Tip 2 diyabetli hastalardan cerrahi yöntemle alınan adacıklarda, sağlıklı donörlerden alınan adacıklara kıyasla NUCB2 mRNA'sında anlamlı azalma olduğu; bunun insülin salgılama kapasitesi ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir.

1.8.1.3.4. Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri

Nesfatin-1'in vücut enerji homeostazına katkıda bulunan enerji harcamalarının düzenlenmesine etkinliği konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır. Enerji metabolizması ile yakından ilişkili olduğu düşünülen ve hipotalamustaki nöronlarda iştah sinyali ile ilgili olduğu kesin tanımlanmış olan nesfatin-1'in enerji dengesi henüz aydınlatılmamış olan bağlantı noktasının olması ihtimaller dahilindedir (Könczöl ve ark., 2012). Könczöl ve ark.(2012) yaptıkları bir çalışmada, nesfatin-1'in intraserebroventriküler uygulamasından sonra farelerde vücut sıcaklığında artış olduğuna ve enerji metabolizmasında etkinliğine dair ilk kanıtları sağlamışlardır. Bu bulgu, doğrudan kalorimetre kullanılarak yapılan bir başka çalışma ile de doğrulanmıştır (Wernecke ve ark.,2014).

1.8.1.3.5. Endokrin Sistem Üzerine Etkileri

Nesfatin-1'in endokrin dokularda bulunması hormon salgılanmasında bir rolü olabileceğini, midede bulunması besin alımında henüz açıklanamayan bir görevi olabileceğini ve pankreasta bulunması da özellikle insülin ve glukagon aracılı glukoz metabolizmasında görev alabileceğine işaret etmektedir. Nesfatin-1'in periferde bulunması ise hipotalamusta anoreksik sinyali düzenlemenin yanı sıra enerji düzenlenmesinde ve nöroendokrin ilişkili fonksiyonlarının da olduğu görüşlerini kuvvetlendirmektedir (García-Galiano ve ark., 2010, Stengel ve Taché 2010).

García-Galiano ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan araştırmada, NUCB2 ekspresyonunun, dişi ratlarda pubertal dönemde attığı ve bu artışa paralel olarak lüteinize hormon artışı olduğu belirtilmiştir. Erişkin ratlarda ise nesfatin-1 enjeksiyonunun lüteinize hormon seviyesinde bir değişiklik meydana getirmediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, nesfatin-1'in adölesan döneme geçişte bir rolünün olduğunu ortaya çıkarmakla beraber, enerji metabolizmasında da düzenleyici bir rolünün olduğu görüşlerini de desteklemektedir.

1.8.1.3.6. Anksiyete ve Depresyon Üzerine Etkileri

Yapılan bir araştırmada, depresyon teşhisi konulmuş hastalarda kontrol grubuna göre serum nesfatin-1 seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Diğer çalışmada ise, nesfatin-1'in uygulaması sonrası anksiyete davranışlarında artış olduğu bildirilmiştir (Merali ve Cayer 2008; Ari ve Ozturk 2011).

1.8.1.3.7. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Stres koşullarında kardiyovasküler cevabın düzenlenmesi için beyinin nesfatin-1 sinyalizasyonunu devreye soktuğu saptanmıştır. İntraserebrospinal nesfatin-1 enjeksiyonunun ortalama arteriyal kan basıncını yükselttiği gözlemlenmiştir (Yosten ve Samson 2009).

1.8.1.3.8. İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Yapılmış olan bir çalışmada, subaraknoid kanama oluşturulmuş ratlarda nesfatin-1'in antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikte olduğu gösterilmiştir. Bu ratlarda, beyin TNF- α , IL-1 β , IL-6 seviyeleri yüksek bulunurken, antioksidan enzim seviyeleri düşük bulunmuştur. Nesfatin-1 uygulanan grupta, serum fizyolojik uygulanan gruba göre nörolojik bozukluklar ve oksidatif beyin hasarında iyileşme

gözlemlenmiştir. Subaraknoid kanama ile gerçekleşen plazma proinflatuar sitokin artışının, yine nesfatin-1 uygulanan grupta baskılandığı saptanmıştır. Bu sonuçlar oksidatif mekanizmalar ile oluşan beyin hasarını önlemede nesfatin-1'in olumlu etkilerinin olduğunu kanıtlamıştır (Ozsavci ve Erşahin 2011).

1.8.1.3.9. Epilepsi Üzerine Etkileri

Aydin ve ark. (2009) tarafından yapılan araştırmaya göre, primer jeneralize epilepsi tanısı alan deneklerin tükürük ve serum nesfatin-1 düzeylerinin kontrole göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu yüksek seviyenin antiepileptik ilaç tedavisi ile azaltılabildiği ayrıca belirtilmiştir. Epileptik ataktan sonra, 48 saate kadar hastalarda serum nesfatin-1 düzeylerinin sağlıklı deneklere göre daha yüksek saptandığı yine aynı makalede belirtilmiştir.

1.8.1.3.10. Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Son yapılan araştırmalarda, dişi sıçanlarda hipotalamik NUCB2 mRNA seviyeleri ve NUCB2/nesfatin-1 protein içeriği pubertal geçiş sırasında arttığı saptanmıştır (García-Galiano ve ark., 2010; Garcia-Galiano ve Tena-Sempere 2013). Bir başka veriye göre ise, yetişkin dişi sıçanlarda, 50 pmol nesfatin-1 intraserebrovasküler (i.c.v.) uygulaması sonrasında plazma lütein hormonunun etkilenmediği saptanmıştır (García-Galiano ve ark., 2010).

Bu veriler ile birlikte, yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, nesfatin-1'in i.c.v. uygulaması sonrasında hipotalamusta gonadotrophin salgılatıcı hormon/GnRH mRNA'sının, hipofizdeki folikül stimüle edici hormon/FSH'un ve lüteinleştirici hormon/LH mRNA'sının ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ve nesfatin-1'in HPG (Hipotalamik-Pituitar-Gonadal) ekseninde önleyici bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Gao ve ark., 2016; Gonzalez ve ark. 2012).

Garces ve ark. (2014) tarafından yapılan araştırmada ise, sıçan plasentasında NUCB2 mRNA ve NUCB2/nesfatin-1 protein ekspresyonunun azaldığı ve gebelik sırasında da plazma NUCB2/nesfatin-1 seviyesinin düşük olduğu açıklanmıştır.

1.8.1.3.11. Nesfatin-1'in Sinir Sistemi Üzerine Olan Etkileri

Beyin nesfatin-1 sinyalizasyonu, kardiyovasküler olayların düzenlenmesinde de görev almaktadır. İntraserebrospinal nesfatin-1 enjeksiyonunun ortalama arteriyel kan basıncını yükselttiği saptanmıştır (Yosten ve Samson 2009).

Yapılan bir çalışma sonucunda, nesfatin-1'in beslenme ve kan basıncını artırıcı etkileri olmadığı ifade edilmiştir. Çalışmada, Nesfatin-1, paraventricüler nukleus'ta oksitosin ile birlikte kolokalizdir ve oksitosin salgılanmasını depolarizasyon yolu ile uyarmaktadır. Nesfatin-1'in oksitosin aracılığı ile melonokortin yolunun aktivasyonunu indüklediği bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı hipertansif etkisinin merkezi oksitosin-melanokortin yollarından biri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak, nesfatin-1'in bu iki sistem üzerinde aynı anda mı yoksa farklı süreler içerisinde mi etki ettiği bilinmemektedir (Yosten ve Samson 2009, García-Galiano ve ark., 2010, Yosten ve Samson 2010).

Sonuç olarak, yukarıda açıklanan bulgulardan da anlaşılacağı gibi, Nesfatin-1'in, farklı beyin bölgelerine etki eden iyi bir anoreksijenik etkiye, gastrointestinal hareketlilik üzerinde inhibe edici özelliğe sahip bir pleiotropik polipeptit olduğu bilinmektedir. Ayrıca nesfatin-1, glukoz seviyelerinin negatif bir regülatörü olarak glukoz homeostazisinde rol oynamakta, termogenezi artırarak enerji harcamalarına katkı sağlamaktadır. Nesfatin-1'in anksiyete ve depresyonun gelişiminde de yer alabileceği, kadın ve erkek hastalarda cinsiyet farklılıklarının araştırılması gereğini vurgulayan farklı bir düzenlemeye sahiptir. En çarpıcı çevresel etkileri kardiyovasküler sistemle ilgilidir, böylece kardiyak kontraktiletiyi, aort gevşemesini iyileştirmektedir. Son olarak, periferik nesfatin-1 gonadal gelişim ve hamilelik sırasında rol oynadığı da ifade edilmiştir (Çizelge 1.4.ve Şekil 1.6.).

1.8.1.3.12. Nesfatin-1'in Pulmoner İnflamasyon Üzerine Olan Etkileri

Akciğer hastalıklarında Nesfatin-1 üzerine yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde akciğer kanseri hastalarında yağ kütlesindeki değişiklikler ile (Cetinkaya, Karagoz, Bilgi ve ark., 2013) kistik fibrozis ve düşük yağ kütlesine sahip olgularda, nesfatin-1 plazma seviyelerinin önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Cohen ve ark., 2013).

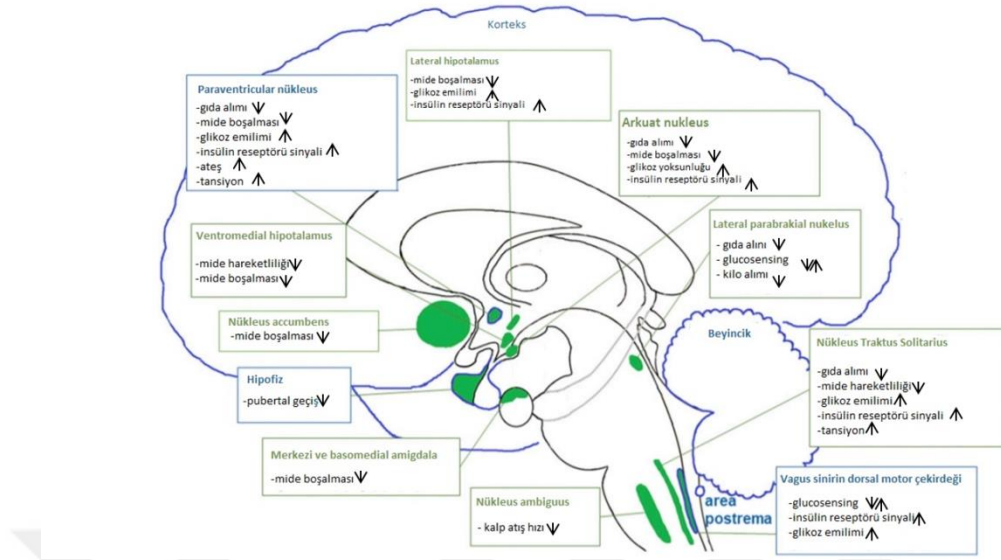


Çizelge 1.4. Nesfatin-1'in santral ve periferel etkileri. Kısaltmalar: ↑, artış / stimülasyon; ↓, azalma / inhibisyon; =, etki yok; NO, nitrik oksit; GSK-3β, glukojen sentaz kinaz 3 beta; PI3K, fosfatidilinositol 3-kinaz; JAK2, Januz kinaz2, STAT3, Sinyal transdüktör ve transkripsiyon aktivatörü 3; AKT, protein kinaz b; 3β-HSD, 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz; GnRH, gonadotropin salgılatıcı hormon; FSH, folikül stimüle edici hormon; LH, luteinizan hormon; UCP-1, uncoupling protein; AMPK, AMP-Aktive Edici Protein Kinaz; CREB, cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein.

Nesfatin-1'in Santral ve Periferel Etkileri.				
	Nesfatin-1 Santral etkileri	Aracı maddeler	Nesfatin-1 Periferel etkileri	Aracı maddeler
Beslenme durumu	Gıda alımı ↓ Su alımı ↑	CRF2 ve histamin, melanokortin-bağımlı pmTOR ile ilişkili	gıda alımı ↓ / = (akut ve kronik)	Leptin bağımsız
Gastrointestinal fonksiyonlar	Mide boşalımı ↓ Gastrik motilite ↓ Asit üretimi ↓	Melanokortin reseptör-bağımlı ↓ H ⁺ / K ⁺ -ATPaz ifade ↓	Mide kasılmaları ↓ Mide ülseri iyileşmesi ↑	Siklooksijenaz 2-bağımlı
Glukoz homeostazi ve metabolizma	Glukoneogenez ↓ Glukoz duyarlı nöronlar ↑ / ↓ Vücut sıcaklığı ↑ Enerji harcaması ↑ Kahverengi yağ dokusu ↑ Vücut ağırlığı kazancı ↓ ↑	Akt / AMPK / dönüştürücü protein 2 bağlanma düzenlenmiş CREB; Melanokortin sinyal 3/4 UCP-1 ekspresyonu ve m-TOR sinyal UCP-1 ekspresyonu	Glukoz uyarılmış insülin salgılaması ↑, Glukagon salgısını ↑ insülin duyarlılığı ↑, Kan şekeri ve insülin direnci ↓ UCP-1 ifadesi ↑, Plazma kolesterol + Triasilgliserol ↓ Lipit birikimi ↓, serbest yağ kullanımı ↑,	K _v 2.1 kanala bağlı, AMPK ve p-ACC fosforilasyonu, m-TOR sinyali, AMPK fosforilasyonu

Çizelge 1.4. Nesfatin-1'in santral ve periferel etkileri. Kısaltmalar: ↑, artış / stimülasyon; ↓, azalma / inhibisyon; =, etki yok; NO, nitrik oksit; GSK-3β, glukojen sentaz kinaz 3 beta; PI3K, fosfatidilinositol 3-kinaz; JAK2, Januz kinaz2, STAT3, Sinyal transdüktör ve transkripsiyon aktivatörü 3; AKT, protein kinaz b; 3β-HSD, 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz; GnRH, gonadotropin salgılatıcı hormon; FSH, folikül stimüle edici hormon; LH, luteinizan hormon; UCP-1, uncoupling protein; AMPK, AMP-Aktive Edici Protein Kinaz; CREB, cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein. (Devam)

Anksiyete ve depresyon	Anksiyete ve depresif davranışları (akut)↑		Anksiyete benzeri davranış (kronik) ↑	
Kardiyovasküler Fonksiyonlar	Tansiyon ↑ Kalp hızı ↑ / ↓	CRF, sempatik, parasempatik, melanokortin-bağımlı	Kan basıncı ↑, kalp ve damarların kasılması ↑, diyastolik hacim, kalp debisi, nabız ↓, aort gevşemesi ↑, kardiyoproteksiyon ↑, kardiyomiyositlerin apoptozu ↑ / ↓ vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, fenotip anahtarı ↑	PI3K , AKT, m-TOR, JAK2 , STAT3 sinyali, endotel, nitrik oksit bağımlı, p-AKT/AKT ve p-GSK-3β / GSK-3β, AKT, apoptojenik protein 1 ve kaspaz-3. PI3K , AKT, m-TOR yolu ve JAK2, STAT3'ün fosforilasyonu
Üreme Fonksiyonlar	Puberte'ye geçiş ↑	Dolaşımdaki gonadotropin ↑ GnRH, Kisspeptin, FSH, LH ve testis steroidojenik akut düzenleyici protein için gen ekspresyonu ↓ 3β-HSD, 17b-HSD, sitokrom P450 için genlerin ifadesi ↑	İnsan koryonik gonadotropine bağımlı testosteron salgısı ↑	



Şekil 1.6. Beynin farklı bölgelerinde Nesfatin-1'in etkileri. ↑, artış / stimulasyon; ↓, düşüş / inhibisyon (Prinz ve ark., 2016).

Yeni bir polipeptid olan nesfatin-1 reseptörünün tanımlanması, nesfatin-1'in fizyolojisinin anlaşılmasında büyük bir adım oluşturmaktadır ve nesfatin-1 tarafından meydana gelen farklı eylemlerin altında yatan etkiler önümüzdeki yıllar içerisinde yapılacak olan araştırmalar ile aydınlanmış olacaktır.

1.9. Visfatin

1.9.1. Tanımı

Visfatin, 1994 yılında lenfositlerden salınan sitokin benzeri yeni moleküller araştırılırken keşfedilmiştir. Keşfedilen molekülün B hücre öncüllerinin olgunlaşması uyarması üzerine pre-B-hücre koloni-artırıcı faktör (pre-B cell colony-enhancing factor, PBEF) olarak isimlendirilmiştir (Samal ve ark., 1994).

Visfatin, nötrofil apoptozisini inhibe etmesi özelliğine sahip olması nedeni ile bir sitokin olarak kabul görmüştür. Bu etkilerin yanı sıra visfatin, lökositlerin aktivasyonu, adezyon moleküllerin sentezini ve proinflamatuvar sitokin sentezini de arttırdığı saptanmıştır (Kukla ve ark., 2011).

Visfatin, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan ve nikotinamid molekülünden nikotinamid mononükleotid (NMN) sentezini gerçekleştiren enzim olan nikotinamid fosforibozil transferaz (Nampt) olarak da bilinmektedir (Wang ve ark., 2012).

Visfatin'in 'Nampt' olarak tanımlanabilmesi için farklı çalışmalar yürütülmüştür. Bakteriler ile yapılan bir çalışmada, bakterilen nikotinamidden NAD biyosentezini gerçekleştirebilmeleri için, laboratuvar ortamında büyüebilmelerini sağlanmasına yönelik nikotinamid mononükleotid'e ihtiyacı olanlar 'V-faktör bağımlı', nikotinamid mononükleotid'e ihtiyacı olmadan, nikotinamidden NAD sentezleyebilenler de 'V-faktör bağımsız' bakteriler olarak ayrılmışlardır. 'V-faktör bağımsız' özelliğine sahip bir bakteri olan *Haemophilus ducreyi*'den 'nadV' olarak isimlendirilen gen klonlanmış ve bu gen ürününün Nampt enzimatik aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Keşfedilen ilgili gen ürününün, memelilerdeki PBEF ile

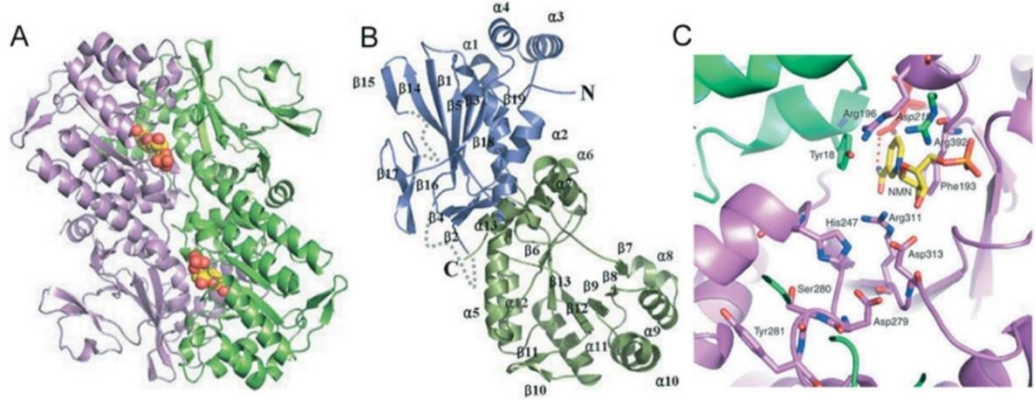
anlamli benzer yapı gösterdiği ve bu yapı benzerliğinin NAD biyosentezinde Nampt ile aynı niteliğe sahip olabileceği ifade edilmiştir (Martin ve ark., 2001).

Fukuhara ve ark. (2005) tarafından yapılan araştırmada, yeni tanımlanan bu protein molekülünün visceral adipoz dokuda üretilmesi nedeniyle 'visfatin' olarak tanımlandığı açıklanmıştır.

1.9.2. Morfolojik ve Genetik Yapısı

Visfatin/PBEF/Nampt'ı kodlayan gen, ilk olarak insan periferel kan lenfosit cDNA'sından izole edilmiştir (Samal ve ark., 1994). Visfatin, 491 aminoasit, 52 kDa ağırlıkta bir polipeptidtir ve geni 7. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır (Sommer ve ark., 2008). Sekresyon sinyal sekansları bulunmasına rağmen, endoplazmik retikulum, golgi ya da mikroveziküllerden bağımsız ve klasik olmayan bir şekilde salgılanabildiği gösterilmiştir (Sommer ve ark., 2008); Schilling ve Hauschildt 2012; Wang ve ark., 2012). Birçok dokuda eksprese edilebilen visfatinin, omurgasızlar, yumuşakçalar, bakteriler, balıklar fareler, sıçanlar ve insanlarda homolog bir yapıda olduğu saptanmıştır (Wang ve ark., 2012).

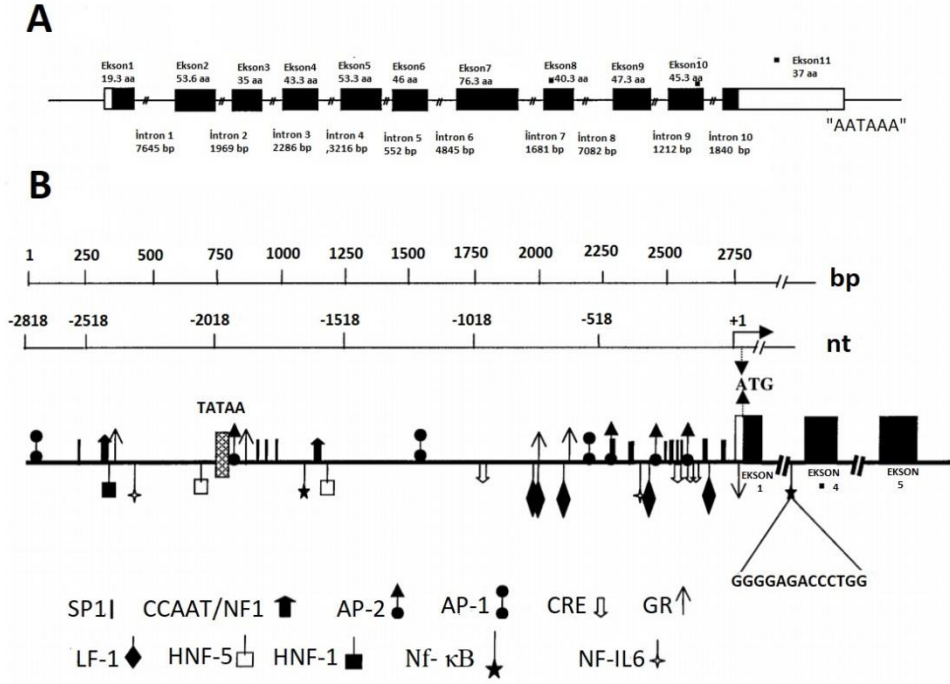
Visfatin homodimer yapısındadır (Şekil 1.9.1.(A) (Sommer ve ark., 2008). Monomerler 22- β tabaka ve 15- α heliks yapıdan oluşmaktadır ve üç adet domain (A,B,C) içermektedir. Proteinin 219. aspartik asit (Asp) aminoasidi, Nampt'ın nikotinamide olan substrat spesifitesinden sorumlu kısmını oluşturmaktadır. Bu yapı, aspartik asit aminoasidi ile nikotinamidin amid grubu arasında hidrojen bağı kurulması neticesinde sağlanmaktadır (Şekil 1.7. (B ve C)) (Zhang ve Heruth, 2011; Wang ve ark., 2012).



Şekil 1.7. Visfatin/PBEF/Nampt'in Yapısı. (A) Farelerde, NMN ile kompleks halinde visfatin/PBEF/Nampt. Monomerik alt birimler sırasıyla yeşil ve mor ile gösterilirken, NMN karbonları sarı renk ile gösterilmiştir. (B) Bir visfatin/PBEF/Nampt monomerinin şematik şerit diyagramı. Ayrı ayrı alanlar sırasıyla mavi ve yeşil renklerle gösterilir. (C) NMN ile kompleks halinde fare visfatin/PBEF/Nampt aktif bölgesi. Monomerik alt birimler sırasıyla yeşil ve mor renk ile gösterilirken, NMN karbonları sarı renk ile gösterilmiştir (Sommer ve ark., 2008).

Nampt'nin yapısal gen kısmı 11 ekzon ve 10 introndan oluşmaktadır. Ekson 1, kısa bir 5'-translasyona uğramamış bölgeyi ve sinyal peptid bölgesini kodlarken, ekson 11, Nampt proteininin karboksil ucunu ve 3'-translasyona uğramamış bölgenin tamamını kodlamaktadır. Visfatin geni 7. kromozomun uzun kolunda yer alan (7q22) polimorfik bir gendir. Uzak bölgede, transkripsiyon başlatma bölgesinden yaklaşık 2 kb yukarı akış yönünde birkaç CAAT kutusu ve TATA benzeri ve başlatıcı sekanslar bulunmaktadır. Bu distal segment bir distal promotör görevi görebildiği ifade edilmiştir. 5'-komşu bölge boyunca birden fazla transkripsiyon faktörü olan özgüllük protein1 (specificity protein 1 (SP1)) bağlanma yeri bulunmuş; Bunlardan 12'si öngörülen proksimal promotör bölgede yer almaktadır. CCAAT/NF1, Aktivatör protein-1 (AP-1) ve Aktivatör protein-2 (AP-2) gibi her yerde bulunan transkripsiyon faktörleri için bağlanma yerleri de tanımlanmıştır. Nükleer faktör-1 (NF-1) için bağlanma bölgeleri varsayılan distal başlatıcı bölgesinde, AP-2 için olanlar esas olarak proksimal başlatıcı bölgesinde ve AP-1 bölgeleri eşit olarak dağıtılmış bulunmaktadır. Ek olarak, gen üzerinde glukokortikoid, IL-6, NF- κ B gibi çeşitli düzenleyici elementler saptanmıştır. Glukokortikoid reseptörü için bağlanma bölgeleri, kortikotropin salma faktörü, cAMP tepki elemanı bağlanma proteini ve NF-IL6 gibi nükleer faktörleri içeren hormonal ve kimyasal olarak duyarlı düzenleyici elemanlar, hem proksimal hem de uzak promotör bölgelerde yer almaktadır. Hormonal olarak duyarlı bir başka element olan Nf- κ B, sadece distal promotör bölgesinde mevcuttur. İntronların analizi üçüncü intronda lokalize edilmiş

NF- κ B bağlanma bölgesinin (GGGAGGCC) varlığını gösterirken 5, 8, 9 ve 10 intronlarında NF- κ B benzeri elementler (GGGAGGCXX) bulunmaktadır (Şekil 1.8.) (Ognjanovic ve ark., 2001).



Şekil 1.8. İnsan PBEF geninin genomik yapısı ve düzenleyici elemanları: (A) İnsan PBEF geninin ekson/intron organizasyonu. Eksonlar, sırasıyla koyu ve açık kutularla gösterilen kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgeler ile dikdörtgenler olarak gösterilmektedir. Eksonların uzunluğu, kodladıkları amino asitlerin sayısı olarak verilmiştir. Intronların uzunluğu ise baz çiftlerinden oluşmaktadır. (B) 5'akış yukarı bölgesindeki düzenleyici elemanların şematik gösterimi. Bp (baz çiftleri) olarak işaretlenmiş çizgi, 5'bölgesi; nt (nükleotidler) olarak işaretlenmiş olanlar, transkripsiyon başlatma bölgesinden uzaklığı göstermektedir. Ekzonlar 1, 4 ve 5 koyu kutucuklar olarak gösterilmektedir. Transkripsiyon başlatma bölgesi +1 olarak işaretlenmiş ve düzenleyici elementleri konumlandırmak için referans nükleotit olarak kullanılmaktadır. Bu cis elemanlarını temsil etmek için kullanılan semboller şemanın altında verilmiştir (Ognjanovic ve ark., 2001).

1.9.3. Sentezi

Visfatinin temel olarak viseral yağ dokusunda eksprese edildiği bildirilmiştir. Yetişkin erkek ve kadınlarda yapılan ve toplamda 101 kişinin katılımı ile gerçekleştirilen çalışmada, plazma visfatin düzeylerinin, viseral yağ kitlesi ile kuvvetli, subkutan yağ kitlesi ile ise zayıf bir ilişki gösterdiği belirlenmiştir (Fukuhara ve ark., 2005).

Bir diğer çalışmada, obez tip 2 diyabetik fare modelinde plazma visfatin düzeylerinin giderek arttığı, bu artışın viseral yağ dokusundaki visfatin mRNA üretiminin artması ile ilişkili olduğu; subkutan yağ dokusu ve karaciğerdeki mRNA üretiminde herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (Fukuhara ve ark., 2005).

Visfatin'in viseral yağ dokusundaki sentezi dışında, lenfosit, monosit, nötrofil, hepatosit, iskelet kası ve pnömositlerde de sentezlendiği ortaya çıkmıştır (Kukla ve ark., 2011). Bir araştırmaya göre plazma visfatin seviyesinin asıl kaynağının lökositler, özellikle de granülositler olduğu ifade edilmiştir (Friebe ve ark., 2011).

Sonuç olarak, visfatin, adipoz dokudan izole edilmesine rağmen, viseral dokuda da az miktarda bulunmaktadır. Aynı zamanda karaciğer ve böbrekte yüksek miktarda, kalpte orta düzeyde akciğer, dalak, testis ve kasta düşük seviyede salınmaktadır (Fukuhara ve ark 2005).

Bu bilgiler ışığında, visfatinin, hem visseral adipoz dokuda otokrin/parakrin etki, hem de çevre organlarda insülin duyarlılığını etkileyen endokrin etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Fukuhara ve ark., 2005).

1.9.4. Potansiyel Fonksiyonları

1.9.4.1. Visfatin'in Metabolizma Üzerindeki Etkileri

Visfatinin metabolizma üzerine çeşitli etkileri olduğu gösterilmiştir. Visfatin hücre içerisinde nikotinamid dinükleotid biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamakta yer alan Nampt olarak görev almaktadır. Bu nedenle hücresel NAD seviyelerini düzenlemekte ve enerji metabolizmasına ek olarak NAD bağımlı enzimler üzerine de etki göstermektedir (Luk ve ark., 2008). Bir araştırmaya göre, visfatinin genetik eksikliğinin, fare embriyogenezisi sırasında erken ölümle sonuçlandığı ifade edilmiştir (Fukuhara ve ark., 2005). NAD bağımlı reaksiyonlara bağlı olarak visfatinin vasküler düz kas hücre canlılığı ve matürasyonunu sağladığı saptanmıştır (Archer 2005; Fukuhara ve ark., 2005).

Bir sitokin olarak visfatinin, TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyebildiği saptanmıştır (Luk ve ark., 2008). Yapılan bazı çalışmalarda, visfatin'in çeşitli inflamatuvar hastalıklarda sistemik dolaşımında yüksek seviyede seyrettiği bildirilmiştir (Luk ve ark., 2008).

Visfatinin bir diğer etkisi, insülin mimetik ve antagonistik özellikleri olan ve viseral yağ doku hücrelerince salınan bir adipositokin oluşudur. (Hug 2005; Luk ve ark., 2008). Visfatinin, insülin reseptörüne insülinden bağımsız farklı bir noktada bağlanarak hücre içine glukoz alımı ve trigliserid sentez artışı gibi etkiler gösterdiği saptanmıştır (Fukuhara ve ark. 2005). Açlık ve tokluk durumlarında visfatin plazma düzeyinin anlamlı oranda değişmediği saptanmış ve bu nedenle glukoz homeostazında insüline oranla daha az etkili olduğu ifade edilmiştir (Pilz ve ark., 2007). Fukuhara ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, fare ve insan modellerinde visfatin serum seviyelerinin viseral yağ doku miktarı ile paralel olarak arttığı saptanmıştır. Bir başka araştırmada ise, viseral ve subkutan yağ doku arasında visfatin ekspresyonu açısından farklılık olmadığı gösterilmiştir (Körnek ve ark.,

2007). Curat ve ark.(2006) çalışmalarında, visfatinin adipositlerden salındığını doğrulamış; ancak, viseral yağ dokuda visfatinin asıl kaynağının makrofajlar olduğunu belirtmiştir (Curat ve ark., 2006). İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in pre-B hücre koloni oluşumunu güçlendirici etkisi olduğu saptanmış olup, visfatinin bu özelliği, insülin benzeri etkiler arasında değerlendirilmektedir (Fukuhara ve ark. 2005).

Bu veriler doğrultusunda inflamatuvar kökenli bazı hastalıkların patogeneğinde Visfatin/PBEF/Nampt'nin rol oynadığı açıkça ifade edilebilmektedir (Luk ve ark., 2008).

1.9.4.2. Visfatin'in İmmünomodülatör Fonksiyonları

NF- κ B, AP-1 sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) gibi transkripsiyon faktörlerinin sitokin ekspresyonunu regüle ettiği bilinmektedir (Luk ve ark., 2008).

NF- κ B, çeşitli sağlık sorunlarında sitokin, kemokin, büyüme faktörleri, adezyon molekülleri ve bazı akut faz proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Uygun olmayan NF- κ B aktivasyonu, otoimmün hastalıklar, astım gibi inflamatuvar olayları tetiklerken, inhibisyonu normal hücrelerin apoptozunda, immün yetmezlik sürecinde ve hücre büyümesinde hasara neden olabilmektedir (Chen ve ark., 1999).

AP-1, keratin sentezleyen esas epitel hücreleri olan keratinosit farklılaşmasında önemli rolü oynamaktadır (Johansen ve ark., 2004). Söz konusu faktörlerin visfatin geni üzerinde bağlanma noktaları bulunmaktadır. Gen üzerinde bu faktörlerin varlığı, visfatinin doğal ve adaptör immunitede rolü olduğunu göstermektedir (Luk ve ark., 2008).

Visfatin'in, IL-8 seviyesinde artışa neden olarak nötrofil infiltrasyonunu hızlandırdığı saptanmıştır. Yapılan bir araştırmada, insan amniyotik epitel hücrelerinde NF- κ B ve AP-1'in inflamatuvar bir uyarı sonrası hem visfatin hem de IL-8 upregülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Kendal ve Bryant-Greenwood 2007).

IL-6 ve TNF- α 'nın visfatin salımı üzerine olan işlevleri hakkında yeterli bilgi olmamakla birlikte, her iki protein molekülünün de adipositlerde visfatin salımını baskıladığı yönünde çalışmalar mevcuttur. Diğer bir çalışmada ise, IL-6'nın amniyotik epitel hücrelerinde, TNF- α 'nın amniyotik epitel hücrelerinde aynı zamanda de nötrofil ve monositlerde visfatin salımını artırdığı açıklanmıştır (Pilz ve ark., 2007, Tsiotra ve ark., 2007). Farelerde yapılan bir araştırmada, visfatin uygulamasından sonra IL-6 seviyelerinde anlamlı artış gözlemlenmiş, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde herhangi bir değişiklik kaydedilmemiştir (Moschen ve ark., 2007).

Luk ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, kültüre insan viseral yağ hücrelerinde TNF- α 'nın visfatin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada, TNF- α ve IL-6'nın viseral yağ dokuda visfatin mRNA seviyelerini artırdığı saptanmıştır (Fukuhara ve ark., 2005).

1.9.4.3. Visfatin'in Renal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Böbrek fonksiyonlarının kötüleşmesinin, plazma Visfatin/PBEF/Nampt düzeylerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yüksek plazma visfatin konsantrasyonunun, kronik böbrek hastalığı olan hastalarda, yaş ve cinsiyet risk faktörlerinden sonra, mortaliteyi sıralamasında yer alabilen bir belirteç olabileceği ifade edilmiştir (Axelsson ve ark., 2007).

1.9.4.4. Visfatin'in Vasküler Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Visfatin, monosit ve makrofajları aktive ederek vasküler hücreler ile etkileşen yaygın bir hücre topluluğu tarafından salınmaktadır. Bu bulgular, sistemik ve lokal olarak sentezlenen visfatinin vasküler sistem üzerinde etkileri olabileceğinin göstergesidir (Peiró ve ark., 2010).

1.9.4.5. Visfatin'in Endotel Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Visfatin'in endotel hücrelerinde salındığı; fakat, söz konusu hücrelerden salınımının olmadığına ilişkin çalışmalar mevcuttur (Lovren ve ark., 2009; Wang ve ark., 2012). Bir çalışmada, visfatin'in proanjiogenik yapıda olduğu, hipoksi durumunda visfatin gen transkripsiyonunun aktive edildiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2007). Visfatinin aynı zamanda ekstrasellüler matriks degradasyonu ile anjiogenezi kolaylaştıran matriks metalloproteinaz MMP-2 ve MMP-9'un salınımı ve aktivitelerini arttırdığı, MMP doku inhibitörlerinin düzeylerini ise azalttığı ifade edilmiştir (Adya ve ark., 2008).

Visfatin'in endotel hücrelerindeki proliferatif etkilerinden, vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) sorumlu olduğu saptanmıştır (Peiró ve ark., 2010).

Visfatin'in, reaktif oksijen radikali oluşumunu arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Kim ve ark., 2008; Kukla ve ark., 2011). Endotel hücrelerinde reaktif oksijen türevi bağımlı NF- κ B aktivasyonu aracılığı ile endotel hücre adezyon moleküllerinin ve vasküler hücre adezyon proteini-1'in ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2008).

Bu bulgular visfatinin, endotel disfonksiyona neden olan inflamasyon ve oksidasyonda önemli rol oynadığının göstergesidir (Wang ve ark., 2012).

1.9.4.6. Visfatin'in Kardiyak Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Visfatin'in hem miyokardiyal fibrozis patogenezinde rol oynadığı, hem de kardiyoprotektif özelliklere sahip olduğu değerlendirilmektedir (Peiró ve ark., 2010). Yapılan bir araştırmada, visfatinin fibroblast hücre çoğalmasını ve kollajen üretimini arttırdığı saptanmıştır (Yu ve ark., 2010).

Lim ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, farelerde iskemi reperfüzyon modeli oluşturularak miyokardiyal reperfüzyon esnasında visfatinin intravenöz verilmesi sonucu infarkt alanında yaklaşık % 20 oranında azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

1.9.4.7. Visfatin/PBEF/Nampt'in İskemik İnme Üzerine Etkileri

Serum visfatin düzeylerinin iskemik inme durumunda yükseldiği ve serum visfatin düzeyinin bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır (Lu ve ark., 2009). Ciddi travmatik beyin hasarı olanlarda serum visfatin seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek saptanmış, Glasgow koma skoru ile artmış visfatin seviyeleri arasında güçlü bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark.,2012).

1.9.4.8. Visfatin'in Kansere Üzerine Etkisi

Farklı kanser tiplerine göre visfatin'in ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Bi ve ark., 2010). Yapılan bir araştırmada, kolorektal kanserde visfatin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Hufton ve ark., 1999; Van ve arkç, 2002). Değişik kanser hücre kültürleri ile yapılan araştırmalarda, visfatin ekspresyonu fazla olan hücrelerin apoptozise ve kemoterapötik ajanlara daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Bi ve ark., 2010).

1.9.4.9. Visfatin'in Glukoz Düzeyleri Üzerine Etkisi

Visfatin'in, adiposit ve myositlerde glukoz alımının arttırdığı, hepatositlerden glukoz çıkışını azalttığı, preadipositlerde trigliserit akümülyasyonunu ve yine bu hücrelerde trigliserit sentezini arttırdığı saptanmıştır (Fukuhara ve ark., 2005). Böylelikle, visfatin'in insülin benzeri etkiler gösterdiği, antidiyabetik bir adipositokin olarak tanımlanabileceği ileri sürülmüştür (Fukuhara ve ark., 2005). Visfatin, insülin ile benzer reseptör afinitesine sahiptir; ancak, plazma konsantrasyonunun insülininden 40-100 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Kukla ve ark., 2011). Visfatinin insülininden farklı olarak başka bir bölge üzerinden insülin reseptörüne bağlandığı ve insülin reseptörünü doğrudan etkileyerek aktive ettiği bildirilmiştir (Fukuhara ve ark., 2005).

Bir araştırmaya göre, uzun süre hiperglisemi durumu olan tip 2 diabetes mellitus hastalarında, serum visfatin düzeyinin yüksek olduğu, kısa dönem glukoz yükselmesi durumunda da plazma visfatin düzeylerinin değişmediği belirtilmiştir (Stofkova 2010). HbA1c üzerine yapılan bir çalışmada, tip 2 diabetes mellitus hastalarında yüksek HbA1c değeri ile visfatin seviyelerinin ilişkili olduğu değerlendirilmiş, tip 1 diabetes mellitus hastalarında ise visfatin düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür (Saddi-Rosa 2010).

1.9.4.10. Visfatin ve Egzersiz

Frydelund-Larsen ve ark. (2007) tarafından yapılan araştırmada, plazma visfatin konsantrasyonlarının egzersiz ile değişmediği, bu adipokinin abdominal deri altı yağ dokusu'nda mRNA ekspresyonunu arttırdığı ifade edilmiştir.

Buna karşılık, bir diğer araştırmada ise, tip 1 diabetes mellitus hastalarında yüksek visfatin konsantrasyonlarının düzenli fiziksel egzersizle azaldığı gösterilmiştir (Haider ve ark., 2006).

Güncel verilere dayanarak, visfatin plazma düzeyleri ile çeşitli tıbbi durumlar arasındaki ilişkiler Çizelge 1.5.'te gösterilmektedir.

Çizelge1.5. Çeşitli tıbbi durumlar ve visfatin arasındaki ilişki (Saddi-Rosa 2010).

Tıbbi Durum	Visfatin
Ateroskleroz	Artmış serum seviyeleri
Endotel fonksiyon bozukluğu	Artmış serum seviyeleri
Kardiyoprotektif	Enfarktüs alanını azaltır
Metabolik sendrom	Kontrollü, Artmış serum seviyeleri
Adiponektin	Kontrollü
Karaciğer yağ hastalığı	Progresif portal inflamasyon ile artmış serum seviyeleri
Tümöral replikasyon	Visfatin antagonisti test ediliyor
Akut akciğer hasarı	Artmış serum seviyeleri
Böbrek yetmezliği	Artmış serum seviyeleri
Beta hücre fonksiyon bozukluğu	Artmış serum seviyeleri
İnsülin direnci	Korelasyon yok
İnsülin-mimetik etkisi	Tartışmalı
Diyabet	Kontrollü
Obezite	Artmış serum seviyeleri
Visceral Yağ	Kontrollü
Vasküler düz kas	İnflamasyonu artmakta

Çalışmamızda, BPD tanısı konmuş hastalarda, son yıllarda tanımlanmış olan yeni adipositokinler ile inflamatuvar mikroçevre ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, BPD tanısı almış olan hastalarda, son yıllarda tanımlanmış olan yeni adipositokinler ile inflamatuvar mikroçevre ilişkisi araştırılmıştır.

Bu kapsamda, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı'nda izlenmekte olan BPD tanısı konmuş hastalardan ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Sosyal Pediatri Bilim Dalına genel kontrol veya aşı yaptırmak gibi enfeksiyon dışı nedenlerle başvuran sağlıklı gönüllülerden toplanan kan örneklerinde, yeni adipositokinlerden nesfatin-1 ve visfatin'in plazma ve mRNA ekspresyon düzeyleri ile, bilinen proinflamatuvar sitokinlerden IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Nf- κ B ve MMP-9 proteinlerinin plazma düzeyleri saptanmış, inflamasyon belirteçlerinden MMP-9 mRNA ekspresyonunun tayini yapılmıştır. Her iki grup için 30 gönüllüden kan örneği toplanmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarından toplanan kan örneklerinden plazma ve RNA izolasyonu yapılmıştır.

Plazma örneklerinde, Nesfatin-1/NUCB2, Visfatin/Nampt/PBEF, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Nf-Kb ve MMP-9 düzeyleri ELİSA yöntemi ile saptanmıştır.

Örneklerin cDNA sentezleri, nesfatin-1, visfatin, MMP-9 proteinlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) analizleri ile tayin edilmiştir.

Tez çalışması, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yürütülmüş olup, hastaların demografik verileri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi tarafından elde edilmiştir.

Çalışmaya Dâhil Olma Kriterleri;

- BPD tanısı ile izleniyor olmak
- 0-3 yaş arasında olmak

Çalışmaya Dâhil Olmama Kriterleri;

- 3 yaşından büyük olmak
- Enfeksiyonu olmak (hem BPD hem de kontrol grubu için)
- Bilinen kronik bir hastalığı olmak (kontrol grubu için)

Anket formları ile hastaların, yaş, doğum haftası doğum ağırlığı, aktüel boyu, aldığı tedaviler, profilaksi ve dozları, evde oksijen kullanım ihtiyacı, ailede tütün ve ürünleri kullanım alışkanlıkları değerlendirilmiştir.

Çalışmada hastaların Bronkopulmoner Displazi parametreleri ve antropometrik ölçümler dışında başka bir işlem talep edilmemiştir. Değerlendirmede, analiz edilen kan sonuçları ve hastanın ailesi tarafından doldurulan form bilgileri kullanılmıştır.

2.1. Kullanılan Cihazlar

- Vorteks (Heidolph),
- Derin dondurucu (-80°C) (Heto Ultra Freeze),
- Soğutmalı santrifüj (Sigma),
- Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 18 Centrifuge)
- Spektrofotometre (Multiskan Go, Thermo Scientific)
- İnkübatörlü çalkalayıcı (BioSan, ES-20)
- Buz makinesi (Scotsman)
- Su banyosu (Daihan Scientific)
- Real Time PCR Cihazı (Qiagen)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Almanya)
- Human Visfatin ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human NEFA (Nesfatin-1) ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human Nf-κB ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-1 ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-6 ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-8 ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-10 ELİSA Kit (Fine Test, Çin),
- Human MMP-9 Platinum ELİSA Kit (eBioscience, Avusturya),
- Human TNF-α Platinum ELİSA Kit (eBioscience, Avusturya),
- RT² First Stand Kit (50)- For cDNA Synthesis Prior To Real-Time PCR (Qiagen, Almanya)
- Sybr green master mix (Qiagen, Almanya)
- Primerler (BT Lab, Türkiye)

2.3. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri, GraphPad Prism (GraphPad Inc., Version 6) istatistik programı ile Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiş, inflamatuvar parametreler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

2.4. Deney Planı

Bu çalışmada BPD tanısı konmuş olan ve genel kontrol veya aşı yaptırmak için enfeksiyon dışı nedenlerle başvuran sağlıklı gönüllülerden toplanan kan örneklerinde yeni adipositokinlerden nesfatin-1 ve visfatin düzeyleri ile bilinen proinflamatuvar ve anitiinflamatuvar proteinlerin düzeyleri ölçülmüş ve inflamasyon ile ilişkisi karşılaştırılmıştır.

2.4.1. İnsan Kanından RNA İzolasyon Protokolü

Bu amaçla QIAamp RNA Blood Mini Kit kullanılmıştır.

Yöntemin Prensibi

RNA'nın kandan saflaştırılması için QIAamp prosedürü sırasında, eritrositler seçici olarak parçalanır ve lökositler ilk santrifüjleme sırasında geri kazanılır. Lökositler daha sonra, RNazları inaktive eden ve sağlam RNA'nın izole edilmesine izin veren yüksek denatüre edici koşullar kullanılarak parçalanır. Lizatın bir QIAshredder döndürme kolonu boyunca kısa bir santrifüjleme ile homojenleştirilmesinden sonra, bağlama koşullarını ayarlamak için etanol eklenir ve örnek QIAamp döndürme kolonuna aktarılır. RNA, kısa bir santrifüjleme basamağı sırasında silika zarına bağlanır. Diğer maddeler yıkanarak uzaklaştırılır ve toplam RNA, herhangi bir sonraki uygulamada doğrudan kullanım için 40 µL veya daha fazla RNaz içermeyen su içinde elüte edilir. Homojenleştirilmiş hücre lizatları, birkaç ay boyunca -70 ° C'de saklanabilir.

İşlem sağlam lökositlere dayandığından, donmuş tam kan kullanılamaz.

Yöntemin Uygulanışı

- EDTA'lı tüplere alınmış olan tam kan örneklerinden 500 µL kan alınıp 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı.
- 1 volüm kan üzerine 5 volüm Buffer EL (Erythrocyte Lysis Buffer) eklendi. (500 µL kan için 2,5 mL Buffer EL eklenir).
- Tüpler 15 - 20 dakika buzda bekletilir. 2 dakika aralıklarla vortekslendi.
- Tüpler buzdan alınır 10 dakika 4000 rpm hızında, 4 °C de santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra supernatant atıldı.
- Oluşan pellet üzerine 1 mL Buffer EL kondu ve tüpler vortekslendi.
- Tüpler 10 dakika 4000 rpm hızında, 4 °C de santrifüj edildi.
- Oluşan pellet üzerine 350 µL Buffer RLT konur. Votekslendi.
- Oluşan lizatları QiaShredder spin kolonlara aktarıldı (mor tüpler)
- 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- QiaShredder kolonlar atılır. Lizatlar kullanıldı.
- Lizat üzerine 350 µL % 70 alkol eklenir ve pipeting yapılır.
- Lizat Qiaamp spin kolonlara aktarıldı (beyaz tüpler)
- 15 saniye 8000 xg hızda santrifüj edildi. Kolonlar yeni toplayıcı kolonlara aktarılır.
- 700 µL Buffer RW1 eklendi.
- 15 saniye 8000 xg hızda santrifüj edilir. Tüpler yeni toplayıcı kolonlara aktarıldı.
- 500 µL Buffer RPE eklenir.
- 15 sn. 8000 xg santrifüj edilir. Tüpler yeni toplayıcı kolonlara aktarılır.
- 500 µL Buffer RPE eklenir.
- 3dakika 14.000 xg maksimum hızda santrifüj edilir.
- Qia amp kolonlar 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alınır ve 40 µL RNase içermeyen su eklendi
- 1 dakika 8000 xg santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atılır. Eppendorf tüpte RNA bulunur. Bu şekilde -80 °C'de saklandı.

RNA Miktar Tayini

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA örneklerinin saflık derecesi 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edilir, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A_{260}/A_{280} absorban oranının 1,8-2,0 olması beklenir.

RNA miktarı reaksiyon başına 2 µg kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait izole edilen RNA örneklerinden belirtilen miktarda alınıp, spektrofotometrede ölçülmek üzere özel plaklara uygulanmış ardından okuması gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.1). Gen ekspresyon analizleri için 100 ng RNA kullanılmıştır.

Plazma İzolasyonu

Mor kapaklı EDTA'lı tüpler ile alınan kan örnekleri santrifüjlenererek daha sonra yapılacak olan çalışmalar için ayrıştırılmıştır.

2.4.2. İnsan Plazmasında Visfatin Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human Visfatin ELİSA Kit (Fine Test) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan Visfatin düzeyini saptamak amacı ile kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan visfatin seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi Visfatin spesifik antikoru ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir.

İmmün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemleri sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti değişikliği göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okunur, ilgili hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

30 ml konsantre yıkama tamponunu deiyonize veya distile su ile veya distile su ile 750 ml'ye seyreltilir.

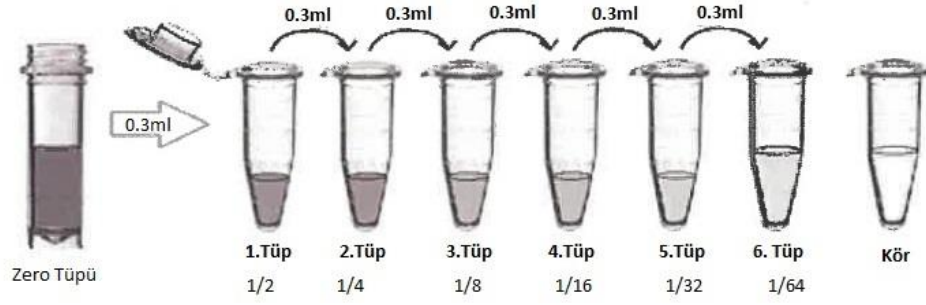
Kullanılmayan çözelti 2-8 °C'de muhafaza edilir.

- **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

Standart tüpünün içerisine 1 ml seyreltme tamponu eklendi. Bu tüp, "zero" tüp olarak etiketlendi.

Standart Zero tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

7 adet ependorf tüpü sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve kör olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml sample dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpe 0,3 ml standart çözelti (zero tüpten) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Zero tüpten 0,3 ml çözelti alındı ve 1. tüpe aktarıldı. Birinci tüpten 0,3ml çözelti alındı 2. Tüpe aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.1). Altıncı tüpteki total hacmimiz 0,6ml oldu. Kör olarak kullanılan tüp'te ise sadece sample dilüsyon tamponu kullanıldı.



Şekil 2.1. Visfatin için standart solüsyonlarının hazırlanması.

- **Biotin işaretli antikor çalışma çözeltisinin hazırlanması**

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

Biyotin tespit antikorunu 1: 100 oranda antikor dilüsyon tamponu ile seyreltilir ve iyice karıştırılır. (örn: 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1µl biotin etiketli antikor eklendi).

- **HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlanması**

Deneyden yarım saat önce hazırlanır.

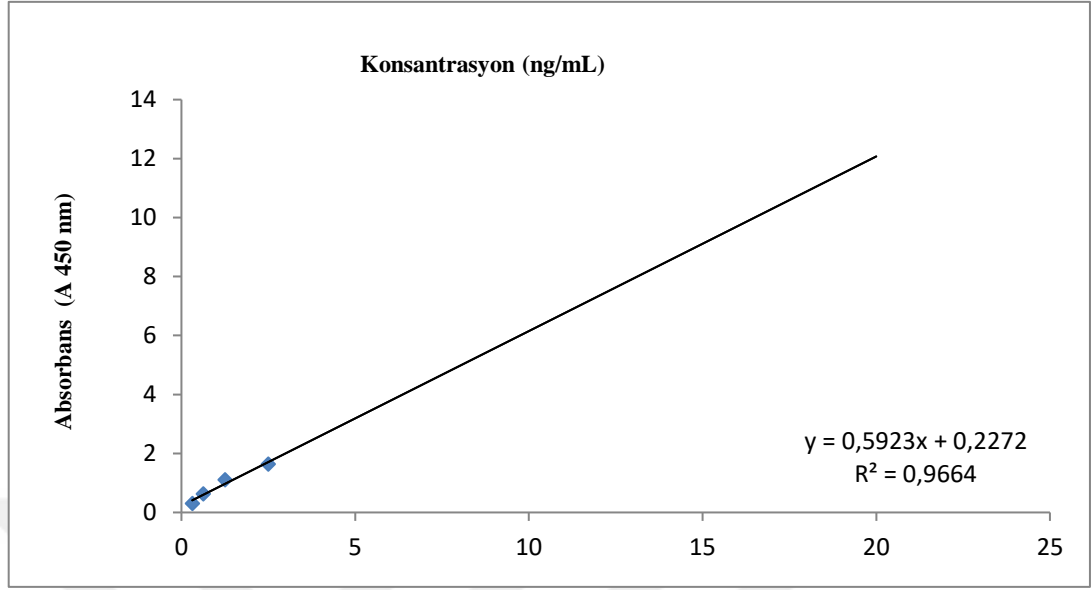
SABC'yi SABC dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyreltilir ve iyice karıştırılır. (Örn: 99 µl SABC dilüsyon tamponuna 1µl SABC eklendi).

- **Test örneklerinin hazırlanması**

Plazmalar, örnek seyreltme tamponu ile en az 1/2 oranında seyreltilir.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı.
- Zero, standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er µL çözeltileri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına ½ oranında dilüe edilmiş çözeltiden 100 µL eklendi.
- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 90 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Standart, örnek ve kör kuyucuklarına 100 µL Bitoin işaretli antikor çalışma çözeltilerinden eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 60 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 100 µL SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 15-20 dakika 37°C inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.2) çizilerek sonuçlar hesaplandı.



Şekil 2.2. Visfatin için kalibrasyon eğrisi.

2.4.3. İnsan Plazmasında Nesfatin-1 Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human NEFA (Nesfatin-1) ELİSA Kit (Fine Test) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan Nesfatin-1 düzeyini saptamak amacı ile kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan Nesfatin-1 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi Nesfatin-1 spesifik antikoruna ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir. Sonrasında immün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti

değişiklik göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

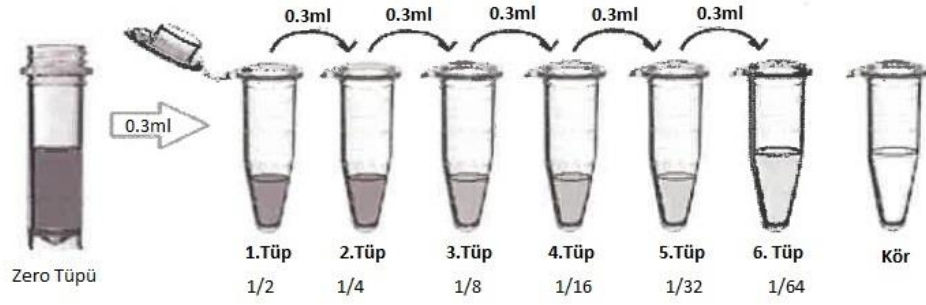
- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

30 ml konsantre yıkama tamponunu deiyonize veya distile su ile veya distile su ile 750 ml'ye seyreltildi.

Kullanılmayan çözelti 2-8 °C'de muhafaza edildi.

- **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

Standart tüpünün içerisine 1 ml seyreltme tamponu eklendi. Bu tüp, "zero" tüp olarak etiketlendi. Standart Zero tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 7 adet ependorf tüpü sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve kör olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml sample dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpe 0,3 ml standart çözelti (zero tüpten) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Zero tüpten 0,3 ml çözelti alındı ve 1. tüpe aktarıldı. Birinci tüpten 0,3ml çözelti alındı 2. Tüpe aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.3.). Altıncı tüpteki total hacmimiz 0,6ml oldu. Kör olarak kullanılan tüp'te ise sadece sample dilüsyon tamponu kullanıldı.



Şekil 2.3. Nesfatin-1 için standart solüsyonlarının hazırlanması.

- **Biotin işaretli antikor çalışma çözeltisinin hazırlanması**

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

Biyotin tespit antikorunu 1: 100 oranda antikor dilüsyon tamponu ile seyreltilir ve iyice karıştırılır. (örn: 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1µl biotin etiketli antikor eklendi).

- **HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlanması**

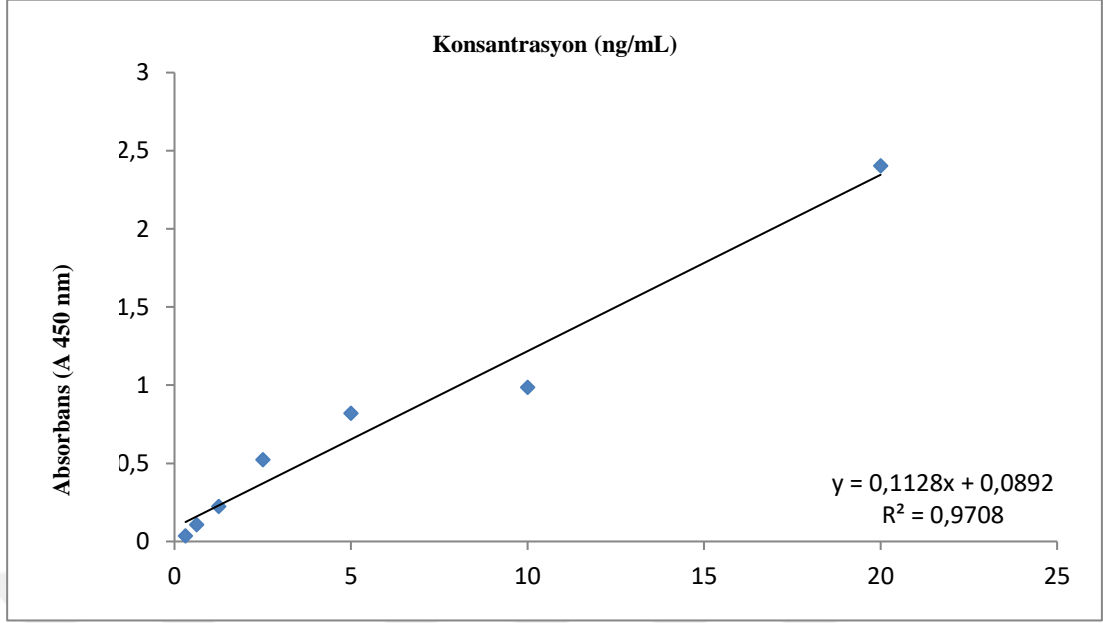
Deneyden yarım saat önce hazırlanır. SABC'yi SABC dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyreltilir ve iyice karıştırılır. (Örn: 99 µl SABC dilüsyon tamponuna 1µl SABC eklendi).

- **Test örneklerinin hazırlanması**

Plazmalar, örnek seyreltme tamponu ile en az 1/2 oranında seyreltilir.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı.
- 50 µL zero, standart ve kör ve örnek çözeltileri kuyucuklarına sırasıyla eklendi. Bekletmeden hemen ardından tüm kuyucuklara Bitoin işaretli antikor çalışma çözeltisinden eklendi.
- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 45 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 100 µL SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 10-20 dakika 37°C inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.4.) çizilerek sonuçlar hesaplandı.



Şekil 2.4. Nesftain-1 kalibrasyon eğrisi.

2.4.4. İnsan Plazmasında IL-4 Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human IL-4 ELİSA Kit (Fine Test) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan IL-4 düzeyini saptamak amacı ile kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan IL-4 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IL-4 spesifik antikoru ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir. Sonrasında immün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti değişikliği

göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikroplak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

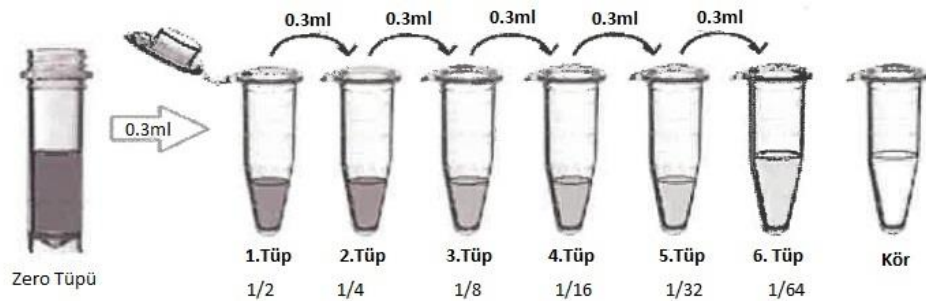
Deiyonize veya damıtılmış su ile 750 ml yıkama tamponu içine 30 ml konsantre yıkama tamponu seyreltili.

Kullanılmayan çözelti 2-8 °C’de muhafaza edildi.

- **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

Standart tüpünün içerisine 1 ml seyreltme tamponu eklendi. Bu tüp, “zero” tüp olarak etiketlendi. Standart Zero tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

7 adet ependorf tüpü sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve kör olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml sample dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpe 0,3 ml standart çözelti (zero tüpten) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Zero tüpten 0,3 ml çözelti alındı ve 1. tüpe aktarıldı. Birinci tüpten 0,3ml çözelti alındı 2. Tüpe aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.5.). Altıncı tüpteki total hacmimiz 0,6 ml oldu. Kör olarak kullanılan tüp’te ise sadece sample dilüsyon tamponu kullanıldı.



Şekil 2.5. IL-4 için standart solüsyonlarının hazırlanması.

- **Biotin işaretili antikor çalışma çözeltisinin hazırlanması**

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

Biyotin tespit antikorunu 1: 100 oranda antikor dilüsyon tamponu ile seyreltilir ve iyice karıştırılır. (örn: 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1 µl biotin etiketli antikor eklendi).

- **HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlanması**

Deneyden yarım saat önce hazırlanır.

SABC'yi SABC dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyreltilir ve iyice karıştırılır. (Örn: 99 µl SABC dilüsyon tamponuna 1 µl SABC eklendi).

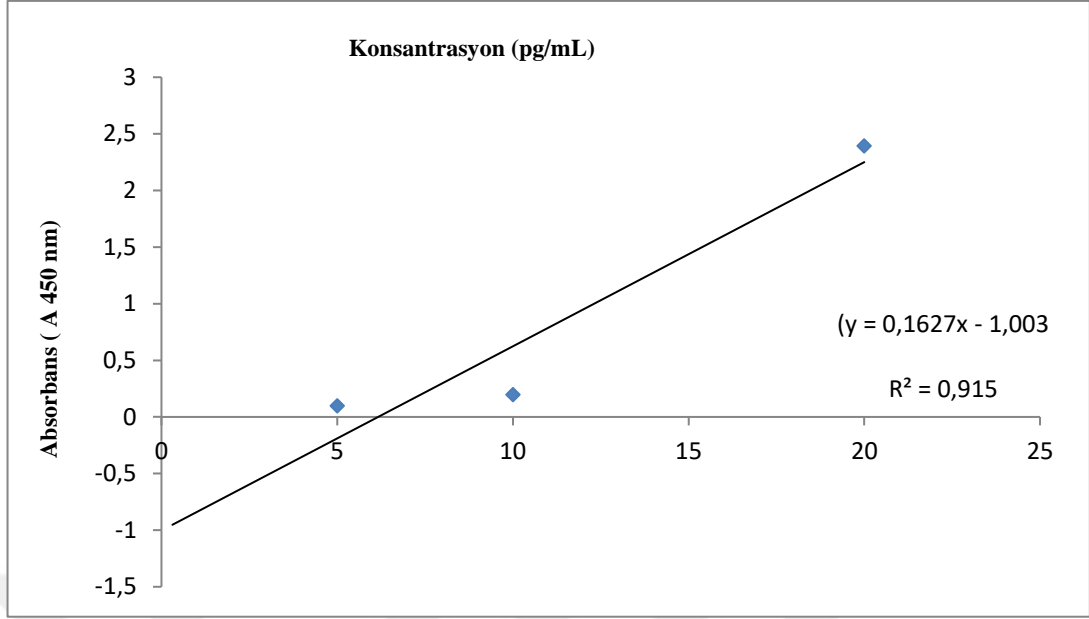
- **Test örneklerinin hazırlanması**

Plazmalar, örnek seyreltme tamponu ile en az 1/2 oranında seyreltilir.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlenir.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkanır.
- Zero, standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er µL çözeltileri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 1/2 oranında dilüe edilmiş çözeltilerden 100 µL eklendi.

- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 90 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Standart, örnek ve kör kuyucuklarına 100 µL Bitoin işaretli antikor çalışma çözeltisinden eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 60 dakika 37 °C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 100 µL SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 15-20 dakika 37°C inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.6.) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.6. IL-4 için kalibrasyon eğrisi.

2.4.5. İnsan Plazmasında IL-10 Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human IL-10 ELİSA Kit (Fine Test) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan IL-10 düzeyini saptamak amacı ile kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan IL-10 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (enzyme linked immunosorbent assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IL-10 spesifik antikoru ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir. Sonrasında immün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti değişiklik

göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikroplak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

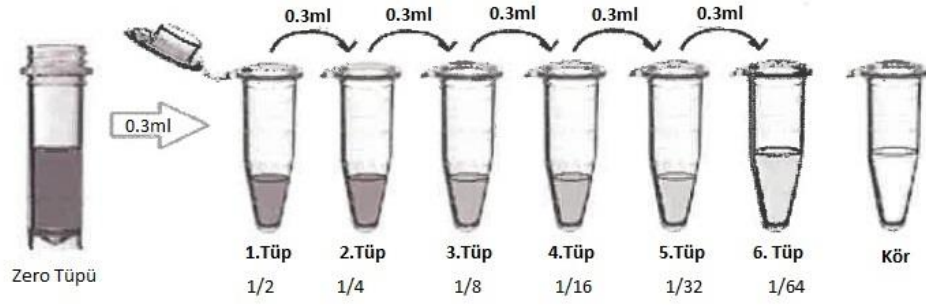
Deiyonize veya damıtılmış su ile 750 ml yıkama tamponu içine 30 ml konsantre yıkama tamponu seyreltildi.

Kullanılmayan çözeltiyi 2-8 °C’de muhafaza edildi.

- **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

Standart tüpünün içerisine 1 ml seyreltme tamponu eklendi. Bu tüp, “zero” tüp olarak etiketlendi. Standart Zero tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

7 adet ependorf tüpü sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve kör olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml sample dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpe 0,3 ml standart çözelti (zero tüpten) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Zero tüpten 0,3 ml çözelti alındı ve 1. tüpe aktarıldı. Birinci tüpten 0,3ml çözelti alındı 2. Tüpe aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.7.). Altıncı tüpteki total hacmimiz 0,6ml oldu. Kör olarak kullanılan tüp’te ise sadece sample dilüsyon tamponu kullanıldı.



Şekil 2.7. IL-10 için standart solüsyonlarının hazırlanması.

- **Biotin işaretli antikor çalışma çözeltisinin hazırlanması**

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

Biyotin tespit antikorunu 1: 100 oranda antikor dilüsyon tamponu ile seyreltilir ve iyice karıştırılır. (örn: 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1µl biotin etiketli antikor eklendi).

- **HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlanması**

Deneyden yarım saat önce hazırlanır.

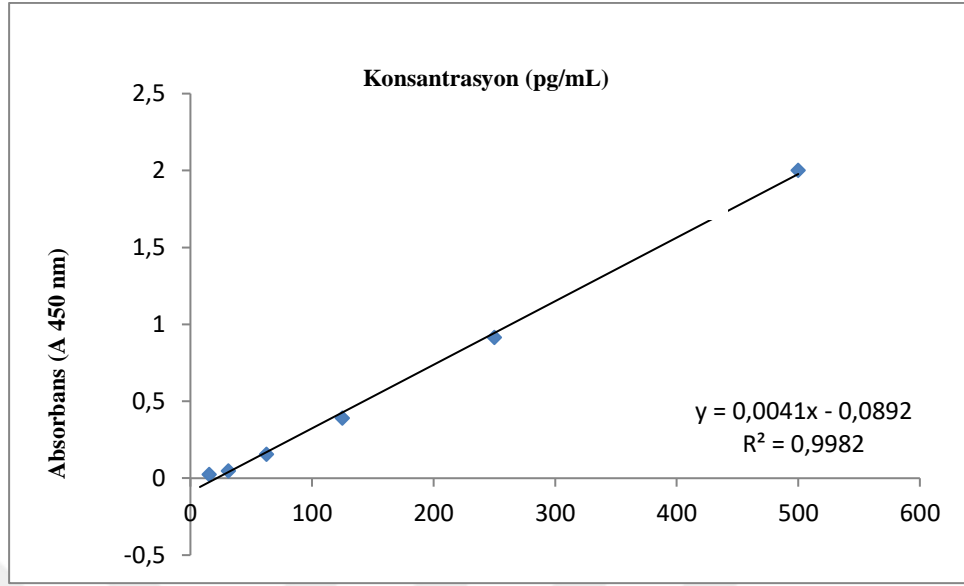
SABC'yi SABC dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyreltilir ve iyice karıştırılır. (Örn: 99 µl SABC dilüsyon tamponuna 1µl SABC eklendi).

- **Test örneklerinin hazırlanması**

Plazmalar, örnek seyreltme tamponu ile 1/2 oranında seyreltilir.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı.
- Zero, standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er µL çözeltileri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına ½ oranında dilüe edilmiş çözeltiden 100 µL eklendi.
- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 90 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Standart, örnek ve kör kuyucuklarına 100 µL Bitoin işaretli antikor çalışma çözeltilerinden eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 60 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 100 µL SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 15-20 dakika 37°C inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.8.) çizilerek sonuçlar hesaplandı.



Şekil 2.8. IL-10 için kalibrasyon eğrisi.

2.4.6. İnsan Plazmasında Nf- κB Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human NF-κB p65 (Nuclear Factor kapa B p65) ELİSA Kit (Fine Test) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan NF-κB düzeyini saptamak amacı ile kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan NF-κB seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi NF-κB spesifik antikoruna ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir. Sonrasında immün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti değişikliği

göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikroplak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

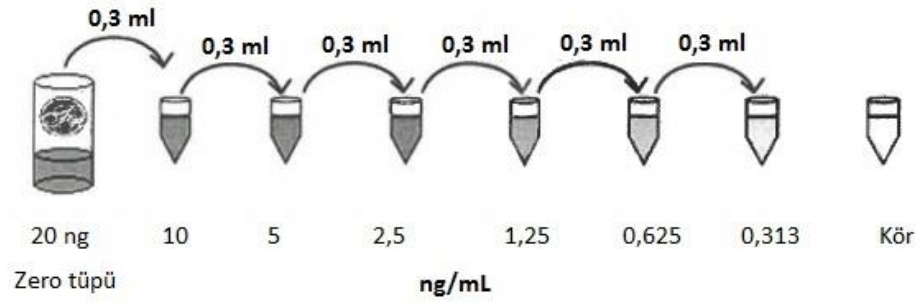
Deiyonize veya damıtılmış su ile 750 ml yıkama tamponu içine 30 ml konsantre yıkama tamponu seyreltildi.

Kullanılmayan çözeltiyi 2-8 °C’de muhafaza edildi.

- **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

20 ng / ml standart çözelti: Standart tüpünün içerisine 1 ml seyreltme tamponu eklendi. Bu tüp, “zero” tüp olarak etiketlendi. Standart Zero tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

7 adet ependorf tüpü sırasıyla 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml 0,625 ng/ml, 0,313ng/ml ve kör olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml sample dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpe 0,3 ml standart çözelti (zero tüpten) ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Zero tüpten 0,3 ml çözelti alındı ve 1. tüpe aktarıldı. Birinci tüpten 0,3ml çözelti alındı 2. Tüpe aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.9.). Altıncı tüpteki total hacmimiz 0,6ml oldu. Kör olarak kullanılan tüp’te ise sadece sample dilüsyon tamponu kullanıldı.



Şekil 2.9. NF-κB için standart solüsyonlarının hazırlanması.

- **Biotin işaretli antikor çalışma çözeltisinin hazırlanması**

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

Biyotin tespit antikorunu 1: 100 oranda antikor dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve iyice karıştırıldı. (örn: 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1µl biotin etiketli antikor eklendi).

- **HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlanması**

Deneyden yarım saat önce hazırlanır.

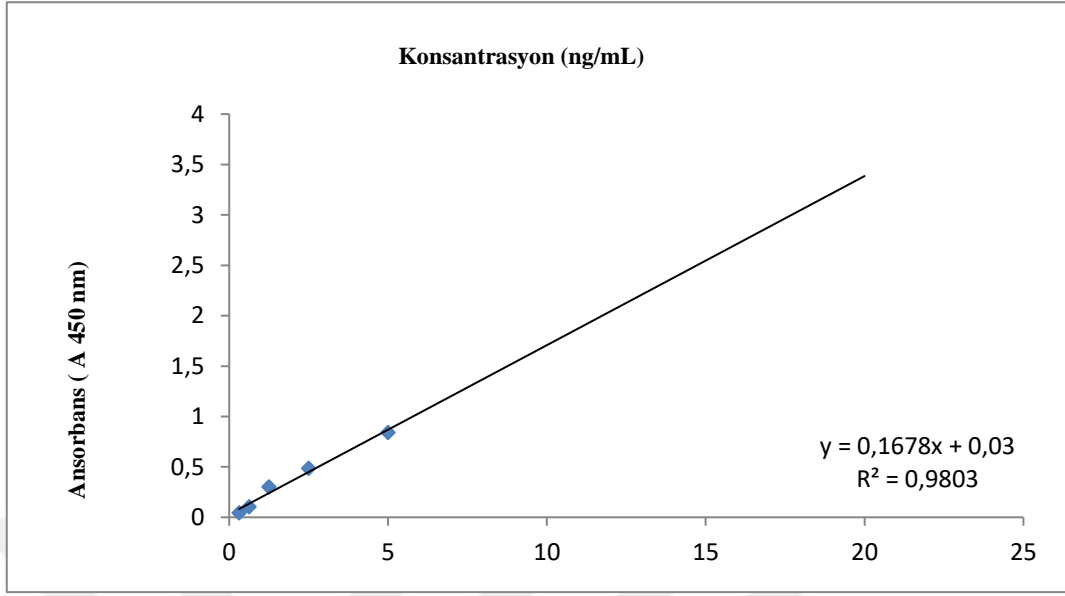
SABC'yi SABC dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyrelti ve iyice karıştırıldı. (Örn: 99 µl SABC dilüsyon tamponuna 1µl SABC eklendi).

- **Test örneklerinin hazırlanması**

Plazmalar, örnek seyreltme tamponu ile 1/2 oranında seyreltildi.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı.
- Zero, standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er µL çözeltileri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına ½ oranında dilüe edilmiş çözeltiden 100 µL eklendi.
- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 90 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Standart, örnek ve kör kuyucuklarına 100 µL Bitoin işaretli antikor çalışma çözeltilerinden eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 60 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 100 µL SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 15-20 dakika 37°C inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.10.) çiziler sonuçlar hesaplandı.



Şekil 2.10. NF-κB için kalibrasyon eğrisi.

2.4.7. İnsan Plazmasında MMP-9 Düzeyi Tayini

Bu amaçla, Human MMP-9 Platinum Elsa Kit (eBioscience) kullanılmıştır. Bu kit, insan serumu, kan plazması ve diğer sıvılardan MMP-9 düzeyini saptamak amacıyla kullanılmaktadır.

Yöntemin Prensibi

İnsan MMP-9 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi MMP-9 spesifik antikoruna ile kaplıdır. Plazma örneği kuyucuklara eklenir. Sonrasında immün kompleks oluşturmak için biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Stop solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyona bağlı olarak renk şiddeti değişikliği

göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikroplak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Reaktiflerin Hazırlanma ve Saklanması

- **Yıkama solüsyonunun hazırlanması**

Konsantre yıkama tamponu (20x) içeriğini (50 mL), temiz 1000 mL'lik kap içerisine alınır. Damıtılmış veya deiyonize su ile 1000 mL'lik nihai hacme getirilir. Köpüklenmeyi önlemek için hafifçe karıştırılır. 2- 25 °C muhafaza edilir.

- **Test tampon çözeltisinin hazırlanması**

Konsantre test tamponunun (20x) tüm içeriğini (5ml) temiz 100 mL'lik kabın içerisine dökülür. Damıtılmış su ile 100 ml nihai hacme getirilir. Köpürmeyi önlemek için hafifçe karıştırılır. 2- 8°C muhafaza edilir.

- **Biotin konjugatının hazırlanması**

Deneyden 30 dakika önce hazırlanmalıdır.

Temiz bir kap içinde Deney Tamponu ile konsantre Biotin-Konjugat çözeltisinin 1:100 oranında seyreltilmesini sağlandı:

- **Streptavidin-HRP hazırlanması**

Deneyden 30 dakika önce hazırlanmalıdır.

Temiz bir kap içinde Deney Tamponu ile konsantre Biotin-Konjugat çözeltisinin 1:1200 oranında seyreltilmesini sağlandı:

- **Standart çözeltinin hazırlanması**

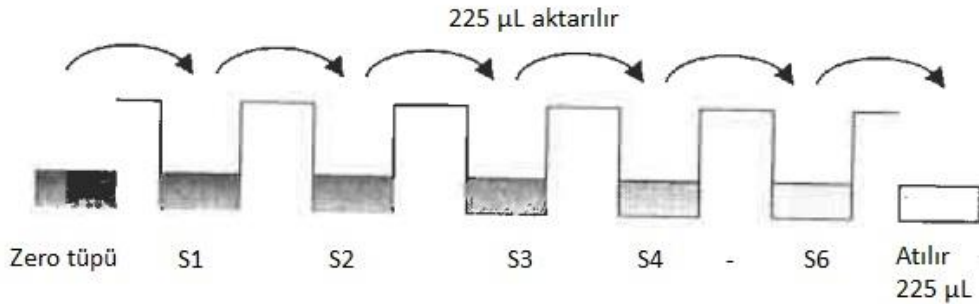
İnsan MMP-9 standardı, şişede belirtilen sulandırma hacmine göre dilüe edildi. Tam ve homojen çözünürlük elde etmek için hafifçe karıştırıldı. (Sulandırma standardının konsantrasyonu = 30 ng / ml)

30 ng / ml standart çözelti: 1/2 seri dilüsyonlar hazırlandı.

7 adet ependorf tüpü sırasıyla Zero, S1,S2, S3,S4,S5, S6 ve kör olarak etiketlendi.

Her bir tüpe 225 µL test tamponu (1x) eklendi.

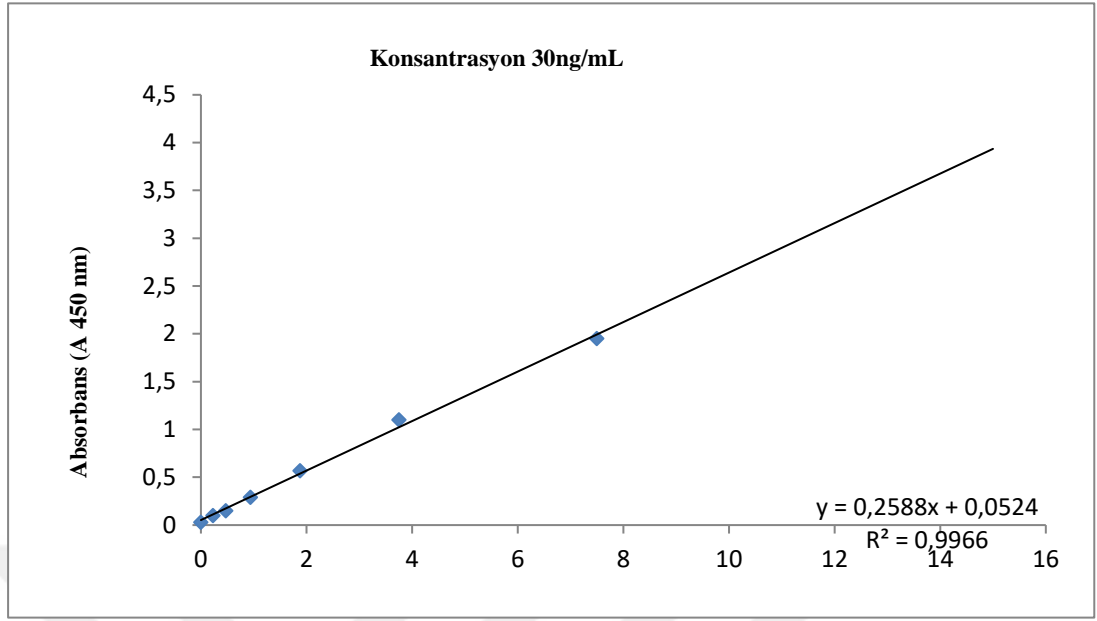
Zero tüpünden 225 µL çözelti alındı ve S1 tüpüne aktarıldı. S1 tüpünden 0,3ml çözelti alındı S2 tüpüne aktarıldı. Altıncı tüp kadar işlem aynı şekilde devam etti (Şekil 2.11.). Kör olarak kullanılan tüp'te ise sadece test tamponu kullanıldı.



Şekil 2.11. MMP-9 için standart solüsyonlarının hazırlanması.

Yöntemin Uygulanışı

- Standart ve test numuneleri için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
- Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı.
- Zero, standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er μL çözeltileri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 90 μL deney tamponundan eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 10 μL plazma eklendi.
- Tüm kuyucuklara 90 μL Biotin konjugatı eklendi.
- Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 2 saat oda sıcaklığına (18-25 °C) inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Her kuyucuğa 100 μL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 1 saat oda sıcaklığına (18-25 °C) inkübe edildi.
- Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Her kuyucuğa 100 μL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, 10 dakika oda sıcaklığına (18-25 °C) inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 100 μL Stop solüsyonu eklendi.
- Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği çizilerek (Şekil 2.12.) sonuçlar hesaplandı.



Şekil 2.12. MMP-9 için kalibrasyon eğrisi.

2.4.8. cDNA Sentezi

Taze insan kanından izole edilen RNA moleküllerinin ters transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirilmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir.

RT² birinci iplikçik kiti, birinci iplikçik cDNA sentezi için verimli, hızlı ve kolay bir prosedür sağlamaktadır.

Reaktiflerin Hazırlanması

- **Genomik DNA eliminasyon karışımı**

Bileşenler ve Miktarlar

RNA: 25 ng-5 µg

GE Tamponu: 2 µL

Nükleaz içermeyen su: Değişken

Toplam Hacim: 10µL

Genomik DNA eliminasyon karışımını 42 ° C'de 5 dakika inkübe edilir, ardından en az 1 dakika boyunca buz üzerine bekletilir.

- **Ters Transkripsiyon Karışımı**

Bileşenler ve 1 (bir) reaksiyonluk hacim

5x BC3 Tmponu: 4 µL

Kontrol P: 1 µL

RE3 Ters Transkripsiyon Karışımı: 2 µL

Nükleaz içermeyen su: 3 µL

Toplam hacim: 10 µL

Yöntemin Uygulanışı

- İzole ettiğimiz RNA'ları hepsi eşit olacak şekilde Nükleaz içermeyen su ile 10 µL' ye tamamlandı.
- Dilüe edilmiş çözeltilerden 8 µL eppendorf tüplerine alındı.
- Üzerine 10 µL DNA eliminasyon karışımı eklendi.
- Genomik DNA'dan kurtulmak için 42°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler soğuk bloğun üzerine alındı ve her birinin üzerine 8 µL ters transkripsiyon karışımı eklendi.
- 20 dakika cDNA cihazında () sentez edildi.
- Son olarak her bir tüpe 91 µL RNase içermeyen su eklendi ve tüpler -20 °C kaldırıldı. Eğer işlem devam etmeyecek ise tüpler -80 °C'ye kaldırılır.

2.4.9. RT-PCR Analizi

Nesfatin-1, Visfatin, MMP-9 proteinlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri saptanmıştır.

Yöntemin Prensibi

DNA' nın çift zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasının sağlanması (denatürasyon), sonrasında sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA molekülüne bağlanmasının sağlanması (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA' ların sentezi), ve tüm aşamaların belirli sayıda tekrarlanmasından oluşmaktadır.

PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini gerçekleştiren thermocycler adı verilen PCR cihazı yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Bu cihazlarda sıcaklık 4 ile 100°C arasında ayarlanabilmekte ve tepkime süresinin sona ermesiyle sıcaklığın 4 °C' ye ayarlanarak eppendorf tüpleri uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir.

PCR, DNA molekülünün kendi kopyasını oluşturması olarak kısaca tanımlanır. Bu işlemin tüp içerisinde gerçekleştirilmektedir. Tepkime, hızlı ve ard arda tekrarlanarak başlangıç DNA miktarının milyon kat artırılması ile son bulmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı

- Her bir gen için, Forward ve Reverse primer miktarları için ayrı ayrı hesaplama yapıldı, karışımlar hazırlandı.
- Her bir gen için Sybr green master mix miktarı hesabı yapıldı.
- Her bir gen için Nükleaz içermeyen su miktarı hesabı yapıldı.

- PCR tüplerine yukarıdaki karışımlardan gerekli miktarlar eklendi.
- PCR tüpüne gerekli miktarda cDNA konuldu.
- Tüplerin kapakları kapatıldı ve PCR cihazına yerleştirildi.
- RT-PCR panelin çalışabilmesi için gerekli olan PCR koşulları aşağıda belirtilmiştir.

PCR koşulları

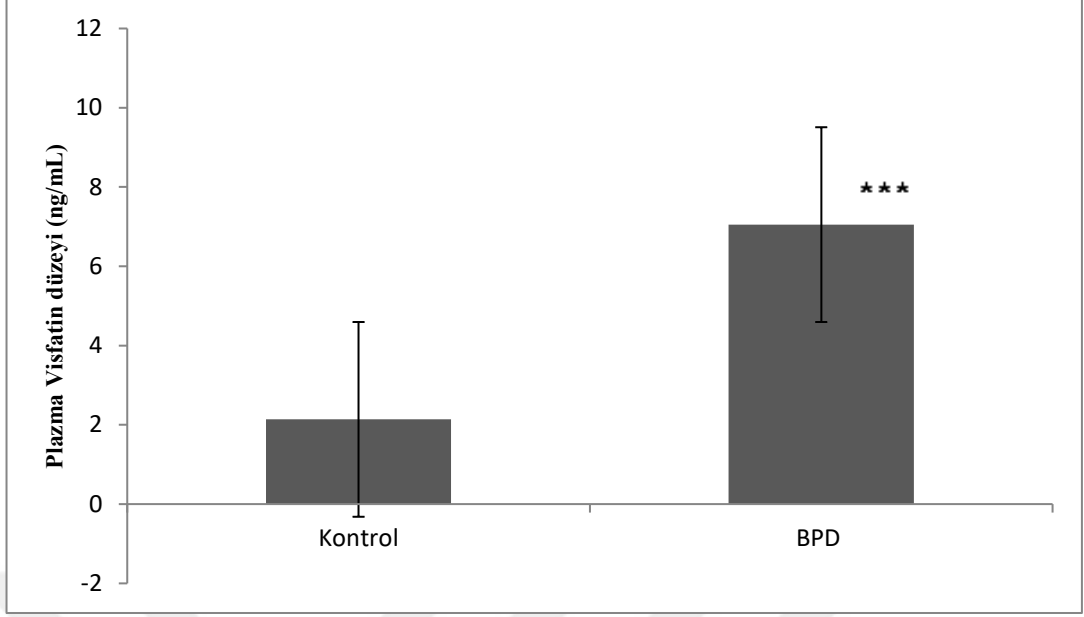
95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 40 saniye, toplam 40 döngü olarak uygulanmıştır.

3.BULGULAR

Yürütülen proje kapsamında, BPD tanısı konmuş 30 gönüllü ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı 30 gönüllü ile analizler gerçekleştirilmiştir.

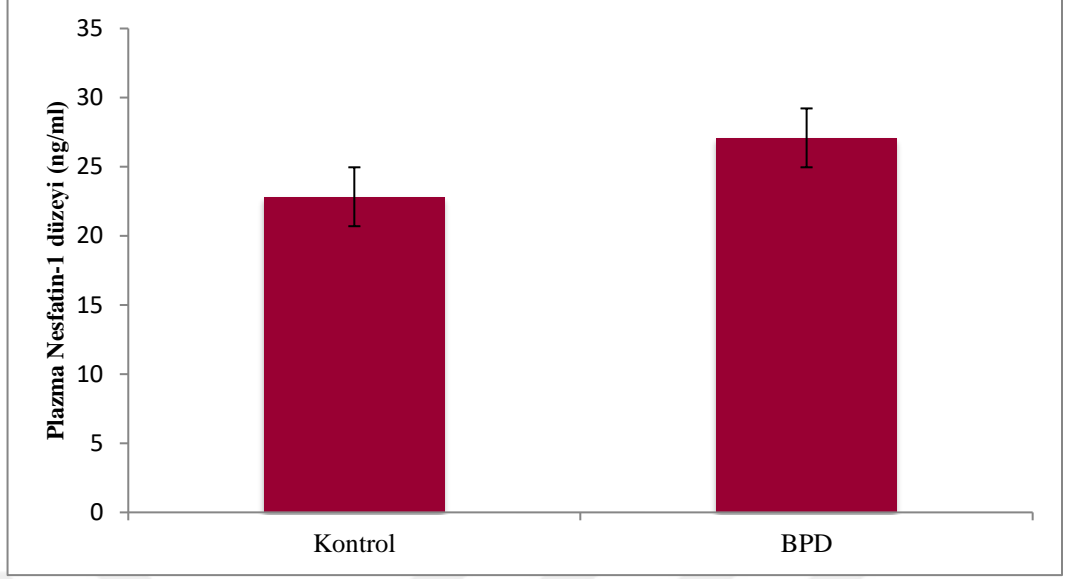
Çizelge. 3.1. BPD ve kontrol grubuna ait demografik veriler.

Değişken	BPD (n=30)	Kontrol (n=30)
Doğum haftası	37 ±24	41±34
Doğum ağırlığı (Gram)	3030±610	4620 ±1690
Yaş (Ay)	32 ±6	36 ± 2
Cinsiyet (% K/E)	6	5,4
Evde oksijen kullanım ihtiyacı (%Hayır)	5,4	8,7
Hamilelikte tütün kullanımı (%)	5,1	8,7
Evde tütün kullanımı (%Evet)	3,6	3,6



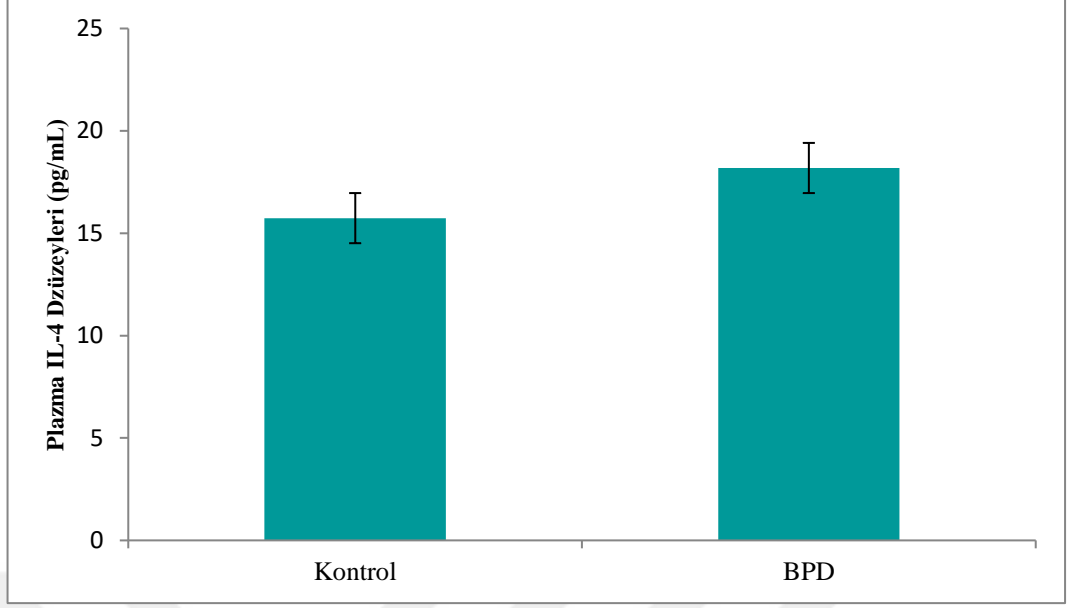
Şekil 3.1. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Visfatin düzeyleri (ng/mL)
***p<0.0001

Çalışmamızda, BPD grubu plazma Visfatin düzeylerinin ($7,05 \pm 4,07$ ng/mL) kontrol grubuna göre ($2,13 \pm 1,66$ ng/mL) anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.1., $p < 0.0001$).



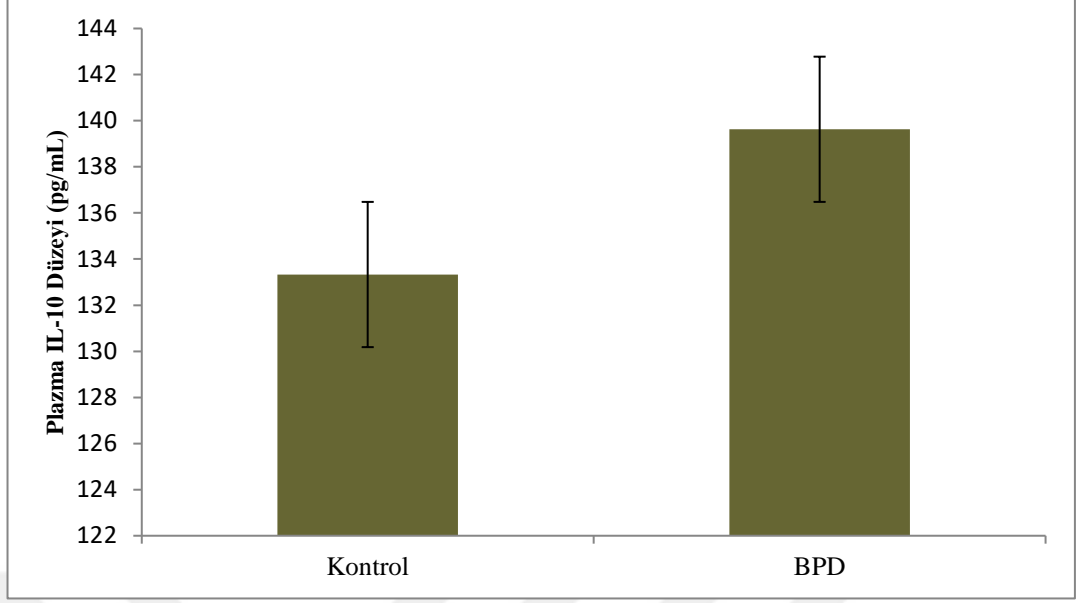
Şekil 3.2. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Nesfatin-1 düzeyleri (ng/mL).

Çalışmamızda, BPD grubu plazma Nesfatin-1 düzeyleri ile (27,09±10,92 ng/mL) kontrol grubu değerleri arasında (22,83±8,34 ng/mL) istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 3.2.).



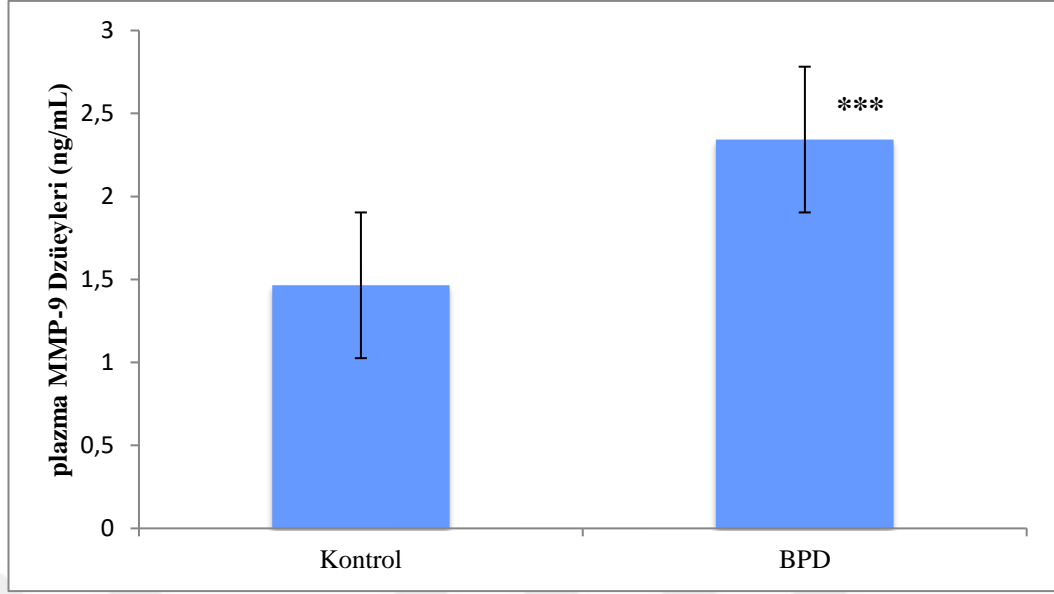
Şekil 3.3. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma IL-4 düzeyleri (pg/mL).

Çalışmamızda, BPD grubu plazma IL-4 düzeyleri ile (18,18±6,86 pg/mL) kontrol grubu (15,73±2,68 pg/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 3.3.).



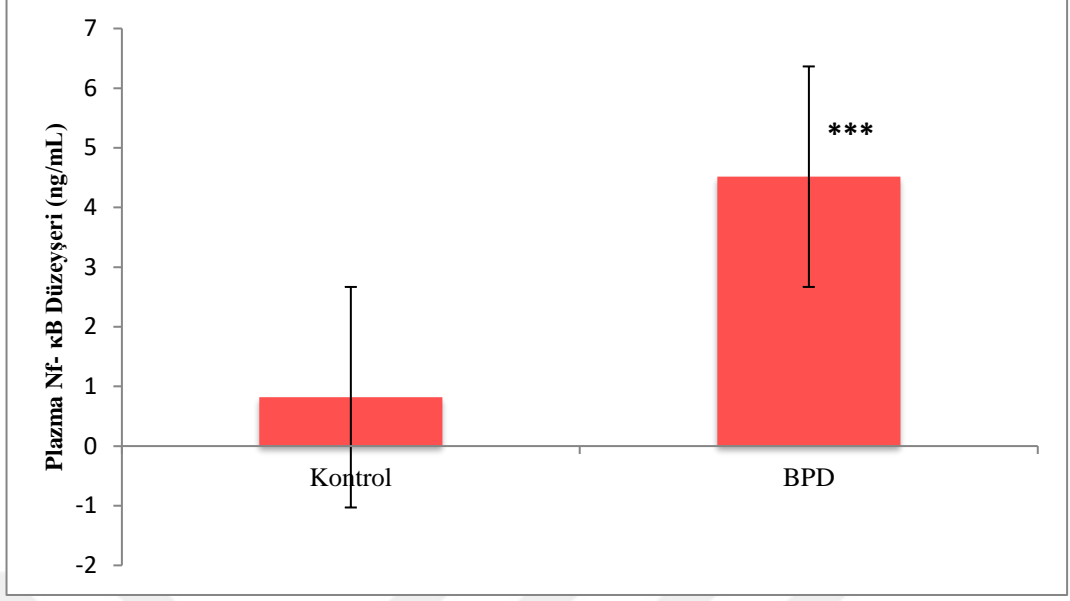
Şekil 3.4. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma IL-10 düzeyleri (pg/mL).

Çalışmamızda, BPD grubu plazma IL-10 düzeyleri ile (139,62±83,65 pg/mL) kontrol grubu (133,32±83,16 pg/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.5. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma MMP-9 düzeyleri (ng/mL)
***p<0.0001

Çalışmamızda, BPD grubu plazma MMP-9 düzeylerinin (2,34±0,94 ng/mL) kontrol grubuna göre (1,46±0,64 ng/mL) anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.5., p<0.0001).



Şekil 3.6. BPD ve kontrol gruplarına ait plazma Nf-κB düzeyleri (ng/mL)
***p<0.0001

Çalışmamızda, BPD grubu plazma Nf-κB düzeylerinin (4,51±3,86 ng/mL) kontrol grubuna göre (0,81±0,58 ng/mL) anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.6. p<0.0001).

Plazma IL-6 düzeyleri, ELİSA kitinin çalışmaması nedeni ile saptanamamıştır. Yeni ELİSA kiti firmadan talep edilmiştir. Kit temin edildikten sonra IL-6 plazma düzeyleri yeniden çalışılacak olup, tez çalışmasına ait yayınlımızda verilerin eklenmesi planlanmaktadır.

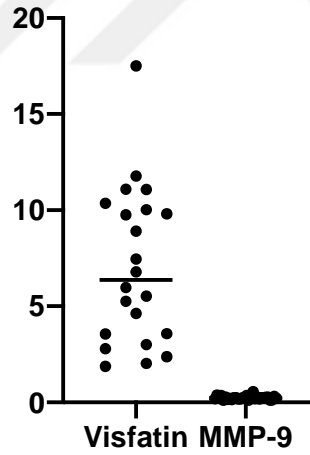
IL-8 ve TNF-α plazma düzeyleri tespit edilebilir aralıkta çıkmamıştır.

BPD ve kontrol grupları plazma düzeylerine ait verilen değerler sırasıyla ortalama ve standart sapma cinsi üzerinden ifade edilmiştir.

Çizelge 3.2. BPD ve kontrol grubu plazma Visfatin, Nesfatin-1, IL-4, IL-10, MMP-9 ve Nf-κB düzeyleri.

	BPD n=30	Kontrol n=30	p değeri
Visfatin (ng/mL)	7,05±4,07 (ng/mL)	2,13±1,66 (ng/mL)	0.0001
Nesfatin-1(ng/mL)	27,09±10,92 (ng/mL)	22,83±8,34 (ng/mL)	0.3180
IL-4 (pg/mL)	18,18±6,86 (pg/mL)	15,73±2,68 (pg/mL)	0.2527
IL-10 (pg/mL)	139,62±83,65 (pg/mL)	133,32±83,16 (pg/mL)	0.1902
MMP-9 (ng/mL)	2,34±0,94 (ng/mL)	1,46±0,64 (ng/mL)	0.0001
Nf-κB (ng/mL)	4,51±3,86 (ng/mL)	0,81±0,58 (ng/mL)	0.0001

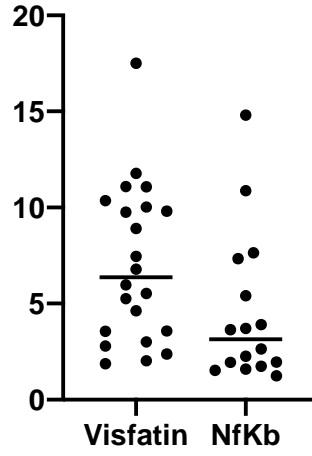
Visfatin-MMP-9



Şekil 3.7. BPD grubuna ait Visfatin ve MMP-9 düzeyi korelasyon eğrisi.

Çalışmamızda, BPD grubuna ait Visfatin düzeyi ile hastaların MMP-9 değerleri arasındaki korelasyon analizleri incelendiğinde; parametreler arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Şekil 3.7.)

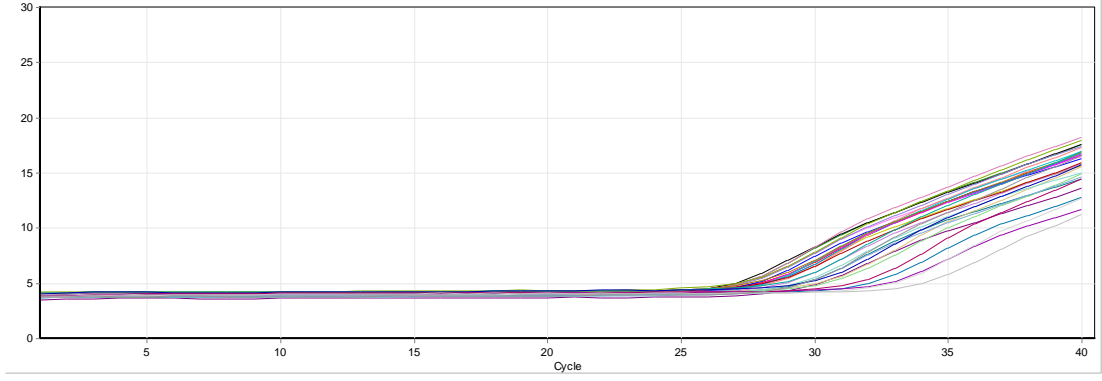
Visfatin NfKb



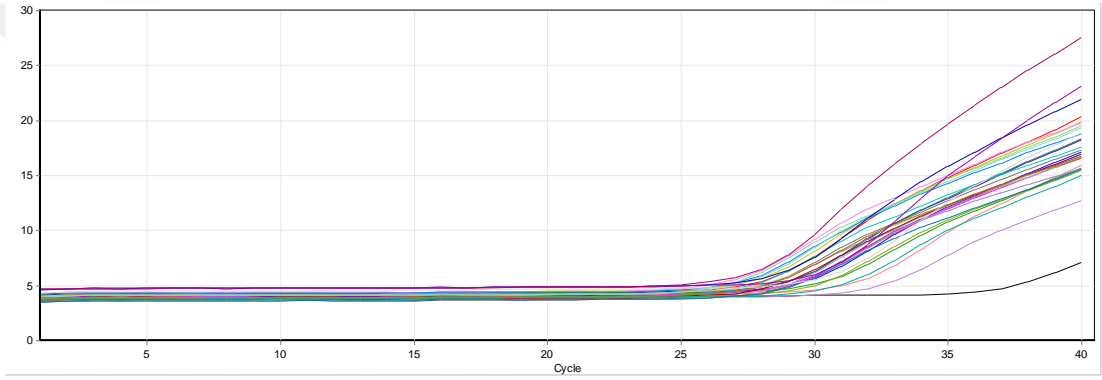
Şekil 3.8. BPD grubuna ait Visfatin ve Nf- κB düzeyi korelasyon eğrisi.

BPD grubuna ait Visfatin düzeyi ile hastaların Nf-κB değerleri arasındaki korelasyon analizleri incelendiğinde; parametreler arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Şekil 3.8.)

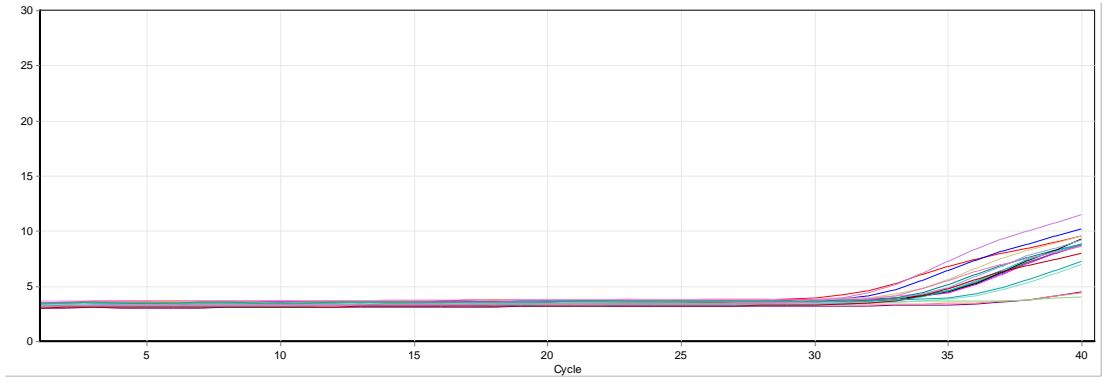
Çalışmamızda gerçek zamanlı PCR yöntemi ile Visfatin, Nesfatin-1 ve MMP-9 için elde edilen amplifikasyon eğrileri ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri aşağıdaki verilmiştir.



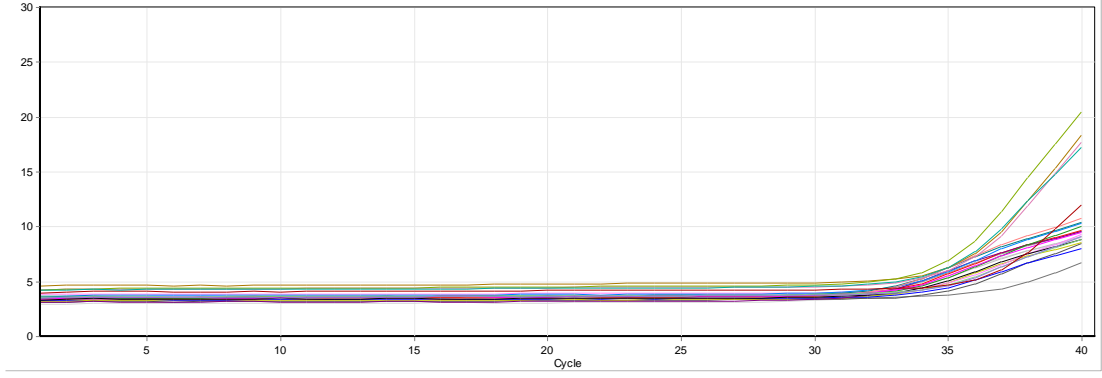
Şekil 3.9. Kontrol grubuna ait visfatin amplifikasyon eğrisi.



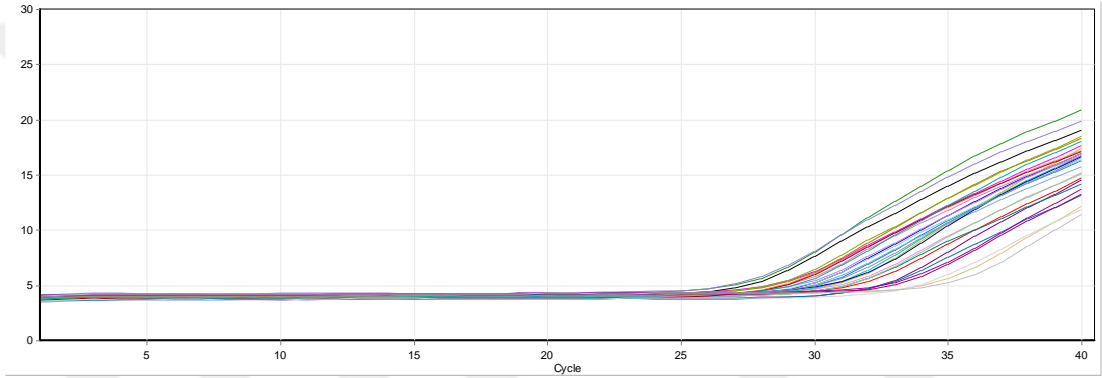
Şekil 3.10. BPD grubuna ait visfatin amplifikasyon eğrisi.



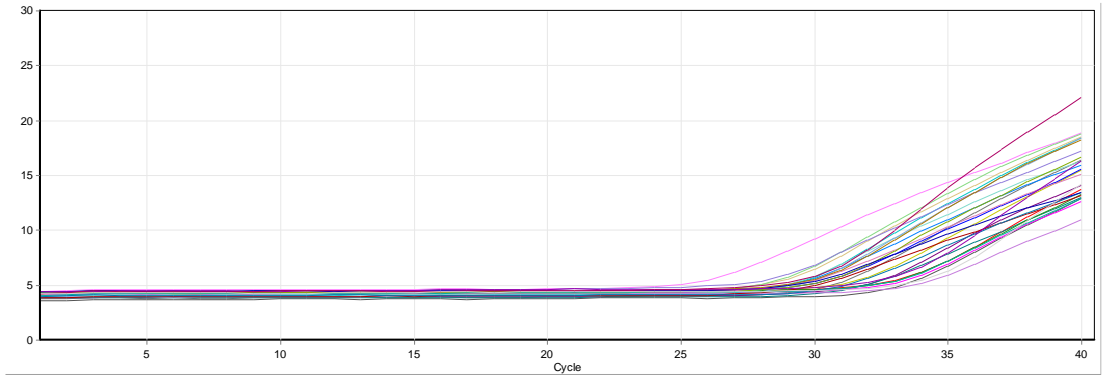
Şekil 3.11. Kontrol grubuna ait Nesfatin-1 amplifikasyon eğrisi.



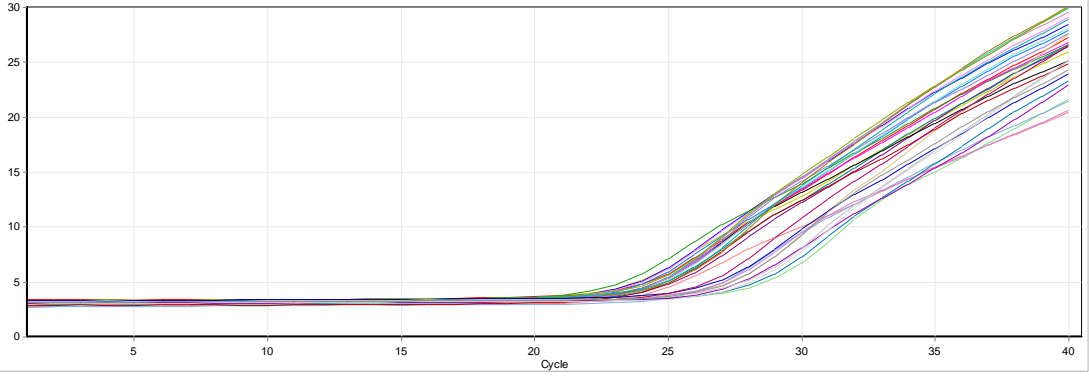
Şekil 3.12. BPD grubuna ait Nesfatin-1 amplifikasyon eğrisi.



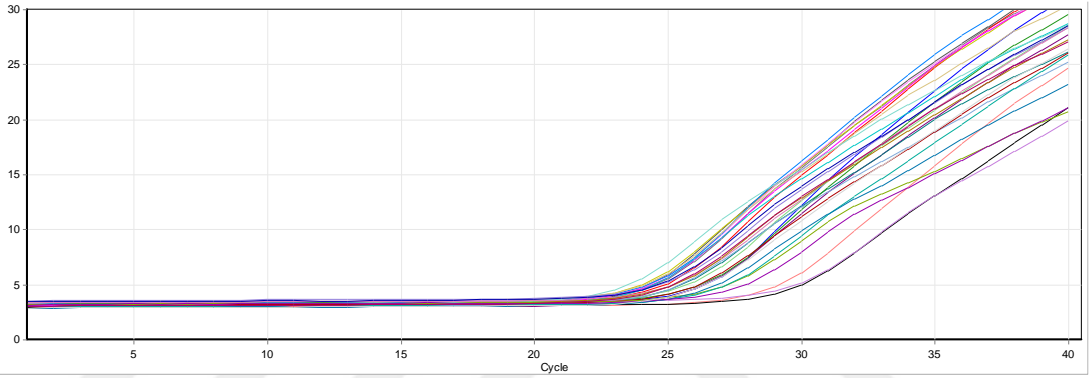
Şekil 3.13. Kontrol grubuna ait MMP-9 amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.14. BPD grubuna ait MMP-9 amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.15. Kontrol grubuna ait β -actin amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.16. BPD grubuna ait β -actin amplifikasyon eğrisi.

Çizelge 3.3. Visfatin, Nesfatin-1 ve MMP-9 genlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerleri	
	Expression Fold Change	P değeri
Visfatin	1,364147835	p<0.05
Nesfatin-1	1,307671349	p<0.05
MMP-9	0,751059963	p<0.05

*p değerleri kontrol grubuna göre belirlenmiştir.

4.TARTIŞMA

Bronkopolmoner displazi, 1967 yılında Northway ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar, devamlı yapay solunum ve yüksek konsantrasyonda oksijen ile tedavi edilen RDS tanısı almış olan yenidoğanlarda gelişen kronik solunum disfonksiyonunun klinik, radyolojik ve patolojik tarifini yapmışlar ve bu durumu BPD olarak adlandırmışlardır (Northway ve ark., 1967).

Hastalığın etiolojisi multifaktöriyel olmakla birlikte, prenatal ve postnatal faktörlerin BPD oluşumunda etkileri olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, tanının ön koşulunu preterm doğum oluşturmaktadır.

Oksijen toksisitesi, barotravma, volutravma ve biyotravma BPD patogenezinin çoklu faktörleri olarak tanımlanmışlardır. Özellikle biyotravmanın, inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin etkileri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Gien ve Kinsella 2011).

BPD'nin patogenezi hakkında çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, moleküler patogenezi bilinmemektedir ve hastalığı önleme yöntemleri yok denecek kadar azdır. Yapılan bazı bilateral araştırmalarda da BPD'nin kalıtsal bir hastalık olduğu ileri sürülmektedir, ki bu genetik çalışmaların BPD patogenezi hakkında detaylı bilgi verebildiği değerlendirilmektedir (Bhandari ve ark. 2006; Lavoie, Pham ve Jang, 2008).

BPD daha önceleri hassas akciğerin ventilasyon ilişkili hasar görmesine bağlı akciğer dokusunda fibrozis gelişmesi ile karakterize olarak tanımlanmakta idi. Daha nazik ventilasyon yöntemlerinin, antenatal steroid ve postnatal surfaktan tedavilerinin kullanıma girmesiyle birlikte BPD fenotipinde dramatik bir değişiklik gözlenmiştir. “Yeni BPD”, azalmış alveolarizasyon ve vaskülarizasyona bağlı olarak akciğer gelişiminde duraksama ile karakterizedir (Jobe, 1999). BPD ilişkili akciğer hasarı geri dönüşümsüzdür ve ilişkili komplikasyonlar erişkin hayatta da devam

etmektedir (Halvorsen, Skadberg, Eide ve ark., 2004; Aukland, 2009). Bu nedenle BPD hem hastanın hem de ailesinin yaşam kalitesi üzerinde oldukça etkili bir hastalıktır.

BPD gelişiminden inflamasyonun sorumlu olduğu ve bu inflamasyonun da mekanik ventilasyon, antenatal ve postnatal enfeksiyonlar ve hiperoksiye bağlı tetiklendiği düşünülmektedir (Ali, Schmidt, Dodd ve ark., 2013; Madurga ve ark., 2013).

Adipokinler (adipositokinler), adipoz doku tarafından salgılanan protein mediatörleridir. Adipokinler, sadece enerji metabolizmasının regülasyonunda değil, ayrıca çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklardaki inflamatuvar yanıtlarda da rol oynamaktadırlar (Fantuzzi, 2005; Ouchi ve ark., 2011). Adiponektin ve leptin gibi adipokinlerin, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklarda gerçekleşen inflamatuvar proseslerdeki anlamlı rollerine ilişkin çok fazla veri bulunmasına rağmen, nesfatin-1 ve visfatin gibi diğer adipokinlerin inflamatuvar akciğer hastalıklarındaki rollerine dair literatürde çok az bilgi bulunmaktadır.

Nesfatin-1, 2006 yılında keşfedilmiş olan yeni bir adipokindir ve ilk olarak ratlarda yapılan açlık ve vücut ağırlığının kontrolü ile ilgili çalışmalar ile ilişkilendirilmiştir (Oh-I, Shimizu, Satoh ve ark.,2006). Nesfatin-1, insan adipoz dokusundan sentezlenmektedir ve yapılan çalışmalar TNF- α , IL-6, insülin ve deksametazonun Nesfatin-1 sentezini artırdığını göstermiştir (Ramanjaneya, Chen, E. Brown ve ark.,2010). Nesfatin-1'in aynı zamanda, ratlarda inflamatuvar yanıtı ve hücre apoptozunu regüle ettiği (Tang ve ark., 2012), ve insanlarda kardiyoprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Angelone, Filice, Pasqua ve ark., 2013).

Akciğer hastalıklarında Nesfatin-1 üzerine yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde akciğer kanseri hastalarında yağ kütlesindeki değişiklikler ile (Cetinkaya, Karagoz, Bilgi ve ark., 2013) kistik fibrozis ve düşük yağ kütlesine sahip olgularında, nesfatin-1 plazma seviyelerinin önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Cohen ve ark., 2013).

Visfatin, aynı zamanda nikotinamid fosforibozil-transferaz (NAMPT) adı ile bilinmektedir ve ilk başta lenfositler, kemik iliği, karaciğer ve kaslarda tanımlanmış iken (Samal ve ark., 1994), daha sonra varlığı akciğerlerde de gösterilmiştir (Adeghate ve ark., 2008). Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1'in pulmoner epitelyal ve endotel hücrelerinde visfatin ekspresyonunu artırdığı in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir (Liu, Li, Cepeda ve ark., 2009.). Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 (Ognjanovic ve Bryant-Greenwood, 2002.) ve TNF- α 'nın (Iqbal ve Zaidi, 2006) da visfatin ekspresyonunu uyardığı bildirilmiştir. Granulositler ve monositler, visfatinin major kaynakları olup (Friebe, Neef, Kratzsch ve ark., 2011), visfatin ayrıca makrofajlar ve adipositler tarafından da üretilmektedir (Curat, Wegner, Sengen'es ve ark., 2006). Visfatinin inflamasyon ve doğal bağışıklığın regülasyonunda yer alan proinflamatuvar bir sitokin olduğu bildirilmektedir (Moschen ark., 2007; Luk, Malam, ve Marshall, 2008). Visfatin akciğerlerde gelişen akut akciğer hasarı ile ilişkili bulunmuştur (Ye, Simon, Maloney ve ark., 2005). Ayrıca, visfatin sentezinin inhibisyonunun, inflamasyonu ve akciğer endotelinde şiddetli virus infeksiyonu ile ilişkili apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (Gao, Mao, Feng ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında, BPD tanısı almış ve sağlıklı gönüllülerde, plazma nesfatin-1 ve visfatin düzeyleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, nesfatin-1 düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır; ancak, visfatin düzeylerinin BPD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek seyrettiği saptanmıştır ($p < 0.0001$).

IL-8'in yanısıra, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinler de erken inflamatuvar yanıtın önemli mediatörleridir. Bu sitokinler, hipoksi, hiperoksi, endotoksin ve diğer bakteri hücresi bileşenleri ile biyofiziksel faktörler tarafından uyarıldıklarında, alveolar makrofajlar, fibroblastlar, tip-2 pnömositler ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir (Lundstrom ve ark., 2000; Jobe ve Ikegami, 1998). BPD gelişen yenidoğanların solunum yolu salgıları ve bronkoalveolar hücrelerinde bu proinflamatuvar sitokinlerin protein düzeylerinin arttığı ve mRNA sekresyonlarının up-regüle olduğu bildirilmiştir (Rindfleisch ve ark., 1996; Jones ve

ark., 1996; Kotecha ve ark., 1996; LoMonaco ve ark., 1996; Jonsson ve ark., 1997; Groneck ve ark., 2001).

Daha önce de bahsedildiği gibi, akciğerlerdeki inflamasyon BPD patogenezinde anahtar role sahiptir. İnflamatuar cevap, prenatal ve postnatal enfeksiyonların yanısıra, serbest oksijen radikallerinin işgali, pozitif basınçlı ventilasyon, patent duktus arteriyozus'a bağlı akciğer kan akımında artıştan da etkilenmektedir. Böylelikle havayollarında ve akciğer dokusuna inflamatuvar hücreler, sitokinler ve humoral mediyatörler göç etmeye başlamaktadırlar. Bu mediyatörler, hücre bütünlüğüne etki ederek, apoptozisi uyararak akciğer yapısı üzerine doğrudan zarar verici etkiye neden olmaktadır. İnsan ve hayvan modellerinde yapılan araştırmalar da bu oluşumu desteklemektedirler.

Moss ve ark. (2002) tarafından yapılan bir araştırmada, preterm kuzularda intrauterin tek doz endotoksin uygulaması sonrasında çeşitli inflamatuvar belirteçlerin belirginleştiği bununla birlikte alveolar ve akciğer damar gelişiminin etkilendiği saptanmıştır.

Fujimura ve ark., (1989) tarafından yapılan bir diğer araştırmada, BPD oluşan prematürelde ilk 72 saat içerisinde, yüksek IgM seviyeleri saptanmış, ayrıca bu bebeklerin trakeobronşiyal sıvısında nötrofil, makrofaj, IL-6, IL-8, TNF- α gibi inflamasyon belirteçlerinin düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir

Kord kanından alınan örnek ile yapılan bir diğer araştırmada, infantlarda yüksek düzeyde IL-8 seviyesi tespit edilerek BPD şiddeti ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Paananen ve ark., 2009).

Koriyoamnionit varlığında amniyotik sıvıda ve kanda IL-6, IL-8, TNF- α gibi sitokin seviyelerinin yüksek seyrettiği saptanmıştır (Muhumuza ve ark., 2004; Thompson ve Bhandari 2008).

Antenatal dönemde meydana gelen enfeksiyon ya da inflamasyon ve *Ureaplasma urealyticum* isimli bakterinin varlığı doğum sırasında bebeklerin havayollarının inflamatuvar etkenlere maruz kalmalarına neden olduğu bildirilmiştir (Yoder ve ark., 2003). Bir diğer çalışmada, 23-32 hafta arasında doğan bebeklerin %23 ünün umbilikal kan kültürlerinde genital *Ureaplasma urealyticum* ve *Mycoplasma hominis* bakterileri tespit edilmiş olup, oluşan sistemik inflamatuvar yanıt nedeniyle söz konusu durumun BPD gelişimi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Goldenberg ve ark., 2008).

Son araştırmalarda, mast hücreleri gibi başka hücreler de akciğer dokusunda biriktiği ve periferik kandaki reaktif T hücrelerinin de BPD gelişimini etkilediği düşünülmektedir (Shahzad ve ark., 2016).

Bağışıklık sistemi ile mikrobiyal patojenler arasındaki etkileşimin karmaşıklığı da patojen enfeksiyonunun BPD gelişimi üzerindeki etkilerinin çelişkili sonuçlarına neden olmaktadır (Shahzad ve ark., 2016).

MMP-2 ve MMP-9, inflamatuvar akciğer hasarı ile ilişkili jelatinazlardır. Jelatinazlar, hücre dışı matrisin proteinlerine hasar vermekte, damar oluşumunu indüklemekte, hücre göçünü arttırmakta, proinflamatuvar sitokinleri aktive etmekte ya da etkisiz hale getirmekte, yeni damar oluşumunu değiştirmekte, inflamatuvar hücrelerin göçünü arttırmakta, böylelikle akciğerler dokusunun yeniden şekillenmesine neden olmaktadır.

MMP-9, kemik iliğinde nötrofil ve eozinofil granüllerinde sentezlenmekte ve depolanmaktadır. IL-1 β , makrofajlar, Clara hücreleri, alveolar tip II hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve bronşiyal epitel hücreleri de MMP-9 üretimini indüklemektedirler. Akciğerlerde artan MMP-9 aktivitesinin, yenidoğan bebeklerde ve hayvan modellerinde BPD gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Speer 2006).

Bu tez çalışmasında, BPD tanısı konmuş hastalardan alınan plazma örneklerinde BPD ile ilişkili olduğu gösterilen, IL-4 IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α Nf- κ B ve MMP-9 proteinlerinin plazma düzeyleri, inflamasyon belirteçlerinden MMP-9 mRNA ekspresyonunu tayinleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Pulmoner inflamasyon, BPD'nin patogenezinde anahtar bir özelliktir. Çeşitli risk faktörleri ile indüklenen bu inflamatuvar proses, inflamatuvar hücreler, sitokinler ve erken doğan prematürelerin pulmoner doku ve solunum yollarındaki humoral aracılardan varlığı ile karakterizedir. Ayrıca yapılan araştırmalar, erken doğan ve BPD'nin çeşitli evrelerindeki prematürelerin solunum yollarında, çok fazla sayıda inflamatuvar hücre bulunduğunu bildirmektedir. İnflamatuvar proses sırasında, çok sayıda aracı molekül, akciğer dokusunun yapısında, hücre bütünlüğünü etkileyen ve apoptozu indükleyen zararlı etkiler meydana getirmektedir. IL-8'in yanısıra, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinler, erken inflamatuvar yanıtın gelişmesinde önemli aracı moleküllerdir. Bu sitokinler, hipoksi, hiperoksi, endotoksin, diğer bakteri hücre duvarı bileşenleri ve biyofiziksel faktörler ile uyarıldıklarında, alveolar makrofajlar, fibroblastlar, tip II pnömositler ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir (Kültürsay, 2003).

Sonuç olarak elde edilen veriler, BPD hastalarında Visfatin düzeylerindeki anlamlı değişikliğin, BPD'de inflamasyon gelişme riski ile ilişki gösterdiğini ortaya koymuştur.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, BPD tanısı konmuş hastalar ile sağlıklı gönüllülerde, son yıllarda tanımlanmış olan yeni adipositokinler olan plazma nesfatin-1 ve visfatin düzeyleri ve mRNA ekspresyonu tayinleri, BPD ile ilişkili olduğu gösterilen, IL-4 IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α Nf- κ B ve MMP-9 proteinlerinin plazma düzeyleri, inflamasyon belirteçlerinden MMP-9 mRNA ekspresyonunu tayinleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre, plazma nesfatin-1 düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır; ancak, visfatin, MMP-9 ve Nf- κ B düzeylerinin BPD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. IL-4, IL-10 düzeyleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Elde edilen korelasyon bulgularına göre, BPD grubuna ait Visfatin düzeyi ile hastaların MMP-9 ve Nf- κ B değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, prematürite, mekanik ventilasyon, antenatal/postnatal inflamasyon, enfeksiyon, pulmoner ödem, genetik faktörler gibi BPD için çoklu risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bunların tek başına ya da çoğunun bir arada gözlemlendiği durumlar olabilmekte ve bu parametreler sonuçlara etki edebilecek faktörler olarak değerlendirilmektedirler.

Çalışmamızda, BPD hastalarında Visfatin, MMP-9 ve Nf- κ B düzeylerindeki anlamlı değişikliklerin, BPD'de inflamasyon gelişme riski ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin, BPD hastalarında klinik hedef olarak anlam taşıyacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Bronkopulmoner Displazi Hastalarında Çeşitli Adipositokin Düzeyleri ve İnflamatuar Mikroçevre İlişkisinin Araştırılması

Bronkopulmoner displazi, 1967 yılında Northway ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar, devamlı yapay solunum ve yüksek konsantrasyonda oksijen ile tedavi edilen RDS tanısı almış olan yenidoğanlarda gelişen kronik solunum disfonksiyonunun klinik, radyolojik ve patolojik tarifini yapmışlar ve bu durumu BPD olarak adlandırmışlardır. Hastalığın etiyolojisi multifaktöriyel olmakla birlikte, prenatal ve postnatal faktörlerin BPD gelişiminde rolleri olduğu bilinmektedir. Ancak, tanımın ön koşulunu preterm doğum oluşturmaktadır. Oksijen toksisitesi, barotravma, volutravma ve biyotravma BPD patogenezinin çoklu faktörleri olarak tanımlanmışlardır. Özellikle biyotravmanın, inflammatuar sitokinlerin ve kemokinlerin etkileri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Pulmoner inflamasyon, BPD'nin patogenezinde anahtar bir özelliktir. Çeşitli risk faktörleri ile indüklenen bu inflammatuar proses, inflammatuar hücreler, sitokinler ve erken doğan prematürlerin pulmoner doku ve solunum yollarındaki humoral aracılardan varlığı ile karakterizedir. Ayrıca yapılan araştırmalar, erken doğan ve BPD'nin çeşitli evrelerindeki prematürlerin solunum yollarında, çok fazla sayıda inflammatuar hücre bulunduğunu bildirmektedir. İnflamatuar proses sırasında, çok sayıda aracı molekül, akciğer dokusunun yapısında, hücre bütünlüğünü etkileyen ve apoptozu indükleyen zararlı etkiler meydana getirmektedir. IL-8 yanı sıra, TNF- α , IL-4, ve IL-6 gibi diğer proinflammatuar sitokinler erken inflammatuar yanıtın gelişmesinde önemli aracı moleküllerdir. Adipokinler, adipoz doku tarafından salgılanan protein yapısında mediatörleridir. Adipokinler, sadece enerji metabolizmasının regülasyonunda değil, ayrıca çeşitli kronik inflammatuar hastalıklardaki inflammatuar yanıtlarda da rol oynamaktadırlar. Adiponektin ve leptin gibi adipokinlerin, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklarda gerçekleşen inflammatuar proseslerdeki anlamlı rollerine ilişkin çok fazla veri bulunmasına rağmen, nesfatin-1 ve visfatin gibi diğer adipokinlerin inflammatuar akciğer hastalıklarındaki rollerine dair çok az bilgi bulunmaktadır. Çalışmamızda, BPD tanısı konmuş hastalar ile sağlıklı gönüllülerde, son yıllarda tanımlanmış olan yeni adipositokinler olan plazma nesfatin-1 ve visfatin düzeyleri ve mRNA ekspresyonu tayinleri, BPD ile ilişkili olduğu gösterilen, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Nf- κ B ve MMP-9 proteinlerinin plazma düzeyleri, inflamasyon belirteçlerinden MMP-9 mRNA ekspresyonunu tayinleri yapılmıştır. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, BPD hastalarında Visfatin düzeylerindeki anlamlı değişikliklerin, BPD'de inflamasyon gelişme riski ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Adipokin, Bronkopulmoner Displazi, İnflamasyon, Nesfatin-1, Visfatin.

SUMMARY

Investigation of Various Adipocytokines Levels and Inflammatory Microenvironment in Patients with Bronchopulmonary Dysplasia

Bronchopulmonary dysplasia was described by Northway et al in 1967. Researchers have made a clinical, radiological, and pathological description of chronic respiratory dysfunction in newborns diagnosed with RDS treated with continuous artificial respiration and high concentrations of oxygen, and named this condition BPD. Although the etiology of the disease is multifactorial, it is known that prenatal and postnatal factors play a role in the development of BPD. However, preterm delivery is the prerequisite for diagnosis. Oxygen toxicity, barotrauma, volutrauma and biotrauma have been defined as multiple factors of BPD pathogenesis. Especially biotrauma has been found to be associated with the effects of inflammatory cytokines and chemokines. Pulmonary inflammation is a key feature in the pathogenesis of BPD. This inflammatory process, induced by various risk factors, is characterized by the presence of inflammatory cells, cytokines and humoral mediators in the pulmonary tissue and respiratory tract of preterm premature babies. In addition, studies have reported that there are too many inflammatory cells in the respiratory tract of premature babies and at various stages of BPD. During the inflammatory process, a large number of mediator molecules produce detrimental effects on the structure of the lung tissue, affecting cell integrity and inducing apoptosis. In addition to IL-8, other pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-4, and IL-6 are important mediators in the development of an early inflammatory response. Adipokines are protein mediators secreted by adipose tissue. Adipokines play a role not only in the regulation of energy metabolism but also in inflammatory responses in various chronic inflammatory diseases. Although there is abundant data on the significant roles of adipokines such as adiponectin and leptin in the inflammatory processes occurring in chronic obstructive pulmonary diseases, little is known about the roles of other adipokines such as nesfatin-1 and visfatin in inflammatory lung diseases. Determination of plasma nesfatin-1 and visfatin levels and mRNA expression, which are new adipocytokines, recently defined in patients diagnosed with BPD and healthy volunteers, plasma levels of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Nf- κ B and MMP-9 proteins shown to be associated with BPD, and MMP-9 mRNA expression, one of the inflammation markers, were determined. The data obtained as a result of our study revealed that significant changes in Visfatin levels in BPD patients are associated with the risk of developing inflammation in BPD.

Keywords: Adipokine, Bronchopulmonary Dysplasia, Inflammation, Nesfatin-1, Visfatin.

KAYNAKLAR

- AALTONEN R, HEIKKINEN T, HAKALA K, LAINE K, ALANEN A (2005). Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol*, **106**: 802-807.
- ADEGHATE E,(2008). Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Current Medicinal Chemistry*, **15(18)**: 1851–1862.
- ADYA R, TAN BK, PUNN A, CHEN J, RANDEVA HS (2008). Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc Res*, **78(2)**: 356-365.
- AHOLA T, LAPATTO R, RAIVIO KO, et al. (2003). N-acetylcystein does not prevent bronchopulmonary dysplasia in immature infants: a randomized controlled trial. *J Pediatr*, **143**: 713-719.
- AKYOL G, (1994). İnterlökinler. *Mikrobiyol Bült*, **28**: 286-293.
- ALI Z, SCHMIDT P, DODD J, et al. (2013). Bronchopulmonary dysplasia: a review. *Arch Gynecol Obstet*, **288**; 325–33.
- ALVIRA CM (2014). Nuclear Factor-Kappa-B Signaling in Lung Development and Disease: One Pathway, Numerous Functions. *Birth Defects Research (Part A)*, **100**: 202–216.
- AMBALAVANAN N, CARLO WA, D'ANGIO CT, MCDONALD SA, DAS A, SCHENDEL D, THORSEN P, HIGGINS RD (2009). Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network: Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*, **123**:1132–1141.
- ANGELONE T, FILICE E, PASQUA T, et al. (2013). Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cellular & Molecular Life Sciences*, **70(3)**: 495–509.
- ANGELONE T, FILICE E, PASQUA T, AMODIO N, GALLUCCIO M, MONTESANTÌ G, QUINTIERÌ AM & CERRA MC (2013). Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**: 495–509.

- ARCHER SL (2005). Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates vascular smooth muscle maturation through a NAD⁺-dependent mechanism: recognition of a new mechanism for cell diversity and redox regulation of vascular tone and remodeling. *Circ Res*, **97**: 4-7.
- ARI M, OZTURK OH (2011) High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **35(2)**: 497-500.
- ARSAN S, TOYGAR AK, OGUZ S (2014). Bronkopulmoner Displazi tanı ve tedavi rehberi. *Türk Neonatoloji Derneği*, 35-38.
- ARSAN S, TOYGAR AK, OGUZ S (2018). Bronkopulmoner Displazi tanı ve tedavi rehberi. *Türk Neonatoloji Derneği*, 4-21.
- AUBIER M, DE TROYER A, SAMPSON M, et al. (1981). Aminophylline improves diaphragmatic contractility. *N Engl J Med*, **305 (5)**: 249-252.
- AUGUSTINE S, AVEY MT, HARRISON B, LOCKE T, GHANNAD M, MOHER D, THÉBAUD B (2017). Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Bronchopulmonary Dysplasia: Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Stem Cells Transl Med*, **6**: 2079-2093.
- AUKLAND SM, ROSENDAHL K, OWENS CM, et al.(2009). Neonatal bronchopulmonary dysplasia predicts abnormal pulmonary HRCT scans in long-term survivors of extreme preterm birth. *Thorax*, **64**: 405–10.
- AXELSSON J, WITASP A, CARRERO, JJ. et al. (2007) Circulating levels of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor 1 in relation to genotype, GFR, body composition, and survival in patients with CKD. *Am J Kidney Dis*, **49(2)**: 237-44.
- AYDIN S, DAG E, OZKAN Y, ERMAN F, DAGII AF, KILIC N, SAHIN I, KARATAS F, YOLDAS T, BARIM AO, et al. (2009). Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **328(1-2)**:49-56.
- BAGCHI A, VISCARDI RM, TACIAK V, et al.(1994). Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in lung lavage of premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*, **36**: 244-52.
- BAIER RJ, LOGGINS J, KRUGER TE, (2003). Interleukin-4 and 13 concentrations in infants at risk to develop bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pediatr*, **18;3**:8.
- BALLARD HO, SHOOK LA, BERNARD P, et al. (2011). Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Pediatr Pulmonol*, **46**: 111–118.

- BALLARD RA, KELLER RL, BLACK DM, BALLARD PL, MERRILL JD, et al. and the TOLSURF Study Group, (2016). Randomized Trial of Late Surfactant Treatment in Ventilated Preterm Infants Receiving inhaled Nitric Oxide. *J Pediatr*, **168**: 23-29.
- BANCALARI E, CLAURE N, GONZALES A, (2005). Patent ductus arteriosus and respiratory outcome in premature infants. *Biol Neonate*, **88**: 192-201.
- BANCALARI E, CLAURE N, SOSENKO IR (2003). Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol*, **8**:63-71.
- BARALDI E, FILIPPONE M, (2007). Chronic lung disease after premature birth. *The New England Journal of Medicine*, **8;357(19)**: 1946-1955.
- BARALDI E, FILIPPONE M (2007). Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J M*, **357 (8)**: 1951.
- BELLANTI JA, KADLEE JV, ESCOBAR-GUOTEMEZ A (1994). Cytokines and the immun response. *Pediatr Clin North Am*, **41**: 597-623.
- BHANDARI A, BHANDARI V (2007). Bronchopulmonary dysplasia: An update. *Indian J Pediatr*, **74 (1)**: 73-77.
- BHANDARI V, BIZZARRO M J, SHETTYA, ZHONG X, PAGE G P, ZHANG H, (2006). Neonatal Genetics Study Group. Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics*, **117(6)**: 1901-1906.
- BI TQ, CHE XM (2010). Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol Ther*, **10(2)**: 119-25
- BLENCOWE H, COUSENS S, CHOU D, OESTERGAARD M, SAY L, MOLLER AB, (2013). Born Too Soon Preterm Birth Action Group. Born too soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, 10 Suppl 1, S2-4755-10-S1-S2. Epub 2013 Nov 15. doi:10.1186/1742-4755-10-S1-S2.
- BONIKOS DS, BENSCH KG, LUDWIN SK, NORTHWAY WH (1975). Oxygen toxicity in the newborn the effect of prolonged 100% O₂ exposure on the lungs of new born mice. *Lab Invest*, **32**:619-635.
- BONNET MS, OUELAA W, TILLEMENT V, TROUSLARD J, JEAN A, GONZALEZ BJ, GOURCEROL G, DALLAPORTA M, TROADEC JD, MOUNIEN L (2013). Gastric distension activates NUCB2/nesfatin-1-expressing neurons in the nucleus of the solitary tract. *Regulatory Peptides*, **10;187**:17-23.

- BOSE C, VAN MARTER LJ, LAUGHON M, O'SHEA TM, ALLRED EN, KARNA P, EHRENKRANZ RA, BOGGESS K, LEVITON A (2009). Extremely Low Gestational Age Newborn Study Investigators: Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics*, **124**: e450–e458.
- BOSE CL, DAMMANN CE, LAUGHON MM (2008). Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **93**: F455–F461.
- BRAILOIU GC, DELIU E, TICA AA, RABINOWITZ JE, TILLEY DG, BENAMAR K, KOCH WJ, BRAILOIU E (2013). Nesfatin-1 activates cardiac vagal neurons of nucleus ambiguus and elicits bradycardia in conscious rats. *Journal of Neurochemistry*, **126(6)**:739-748.
- BRAILOIU GC, DUN SL, BRAILOIU E, INAN S, YANG J, CHANG JK, DUN NJ (2007). Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, **148**: 5088–5094.
- BURRI PH (2006). Structural aspects of postnatal lung development-alveolar formation and growth. *Biol Neonate*, **89**:313-322.
- CARLTON DP, ALBERTINE KH, CHO SC, et al. (1997). Role of neutrophils in lung vascular injury and edema after premature birth in lambs. *J Apply Physiol*, **83**:1307-1317.
- CAYABYAB RG, JONES CA, KWONG KY, et al. (2003). Interleukin-1beta in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*, **14**: 205-11.
- CETINKAYA H, KARAGOZ B, BILGI O, et al. (2013). Nesfatin-1 in advanced lung cancer patients with weight loss. *Regulatory Peptides*, **10;181**: 1–3.
- CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, DEMERS LM (1999). New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*, **45**: 7- 17.
- CHEN J, WENG JF, HONG WC, LUO LF, YU W, LUO SD (2012). Change in plasma visfatin level after severe traumatic brain injury. *Peptides*, **38(1)**: 8-12.
- CHOI P VE REISER H (1998). IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin Exp Immunol*, **113(3)**:317-319.
- CHU WM (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, **328(2)**: 222–225.
- COALSON JJ (2003). Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*, **8**:73-81.

- COALSON JJ (2006). Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*, **30**: 179–184.
- COALSON JJ, WINTER VT, LEMONS RA, et al. (1999). Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med*, **160**:1333-1346.
- COHEN RI, GINSBERG N, TSANG D, WANN LC, YE X, LIU SF, (2013). Association of nesfatin-1 and fat mass in cystic fibrosis. *Respiration*, **86(4)**: 312–317.
- COWLEY M.A, GROVE K.L. (2006) To be or NUCB2, is nesfatin the answer? *Cell Metab*, **4(6)**:421-2.
- CROWLEY PA (1995). Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol*, **173(1)**: 322-35.
- CURAT CA, WEGNER V, SENGEN`ES C, et al. (2006). Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*, **49(4)**: 744–747.
- DAIKOKU NH, KALTREIDER NF, KHOUZAMI A, SPENCER M, JOHNSON JW (1982). Premature rupture of membranes and spontaneous preterm labor. Maternal endometritis risks. *Obstet Gynecol*, **59**: 13-20.
- DARLOW BA, GRAHAM PJ, ROJAS-REYES MX (2016). Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long- term morbidity in very low birth weight infants. Cochrane Database of Systematic Reviews, CD000501.
- DE DOOY JJ, MAHIEU LM, VAN BEVER HP (2001). The role of inflammation in development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr*, **160(8)**: 457-63.
- DEAS DE, MACKAY SA, MCDONNELL HT (2003). Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology*, **32**: 82-104.
- DEREE J, LALL R, MELBOSTAD H, et al. (2006). Neutrophil Degranulation and the Effects of Phosphodiesterase Inhibition. *J Surg Res*, **133**: 22–8.
- DOBBS LG, (1989). Pulmonary surfactant. *Ann Rev Med*, 40: 431-446.
- DOYLE LW, HALLIDAY HL, EHRENKRANZ RA, et al.(2005) Impact of postnatal systemic corticosteroids on mortality and cerebral palsy in preterm infants: Effect modification by risk for chronic lung disease. *Pediatrics*, **115**: 655-661.
- DURUM SK, OPENHEIM JJ (1993). Proinflammatory cytokines and immunity. In: Paul WE (ed). Fundamental immunology. 3rd edition. *New York: Raven Press Ltd*, 801-35.

- EHRENKRANZ RA, WALSH MC, VOHR BR, JOBE AH, et al.(2005). Validation of the National Institutes of Health Consensus Definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, **116**:1353-1360.
- FANAROFF AA, STOLL BJ, WRIGHT LL, CARLO WA, EHRENKRANZ RA, STARK AR, BAUER CR, DONOVAN EF, KORONES SB, LAPTOOK AR, LEMONS JA, OH W, PAPILE L-A, SHANKARAN S, STEVENSON DK, TYSON JE AND POOLE WK (2007). Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*, **196(2)**: 147.e1-8.
- FANTUZZI G, (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **115(5)**: 911–920.
- FEHRENBACH H (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, **2**:33-46.
- FERREIRA PJ, BUNCH TJ, ALBERTINA KH, et al. (2000). Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants. *J Pediatr*,**136**:466-472.
- FOO KS, BRAUNER H, OSTENSON CG & BROBERGER C (2010). Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *Journal of Endocrinology*, **204(3)**:255-63.
- FOO KS, BRAUNER H, OSTENSON CG, BROBERGER C (2010). Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol*, **204(3)**:255–263.
- FRIEBE D, NEEF M, KRATZSCH J, et al. (2011). Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia*, **54(5)**: 1200–1211. doi: 10.1007/s00125-010-2042-z.
- FRIEBE D, NEEF M, KRATZSCH J, ERBS S, DITTRICH K, GARTEN A, et al. (2011). Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/preB cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia*, **54(5)**: 1200-1211.
- FRYDELUND-LARSEN, L., AKERSTROM, T., NIELSEN, S., KELLER, P., KELLER, C. AND PEDERSEN, B. K. (2007). Visfatin mRNA expression in human subcutaneous adipose tissue is regulated by exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292(1)**: E24-31.
- FUJIMURA M, TAKEUCHI T, KITAJIMA H, NAKAYAMA M. Chorioamnionitis and serum IgM in Wilson–Mikity syndrome. *Arch Dis Child* 1989;**64(10)**:1379–83.

- FUKUHARA A, MATSUDA M, NISHIZAWA M, SEGAWA K, TANAKA M, KISHIMOTO K, et al (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 21; **307(5708)**: 426-30.
- GAO W, MAO Q, FENG AW, et al. (2011). Inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor attenuates inflammation and apoptosis induced by pandemic H1N1 2009 in lung endothelium. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, **178(2)**: 235–241.
- GAO X, ZHANG K, SONG M, LI X, LUO L, TIAN Y, ZHANG Y, LI Y, ZHANG X, LING Y, et al. (2016). Role of nesfatin-1 in the reproductive axis of male rat. *Scientific Reports*, **6**: 32877.
- GARCES MF, POVEDA NE, SANCHEZ E, SANCHEZ AY, BRAVO SB, VAZQUEZ MJ, DIEGUEZ C, NOGUEIRAS R & CAMINOS JE (2014). Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy. *Physiology and Behavior*, **22;133**:216-22.
- GARCIA-GALIANO D, TENA-SEMPERE M (2013). Emerging roles of NUCB2/nesfatin-1 in the metabolic control of reproduction. *Current Pharmaceutical Design*, **19**: 6966–6972.
- GARCIA-GALIANO D, NAVARRO VM, ROA J, RUIZ-PINO F, SANCHEZ-GARRIDO MA, PINEDA R, CASTELLANO JM, ROMERO M, AGUILAR E, GAYTAN F., DIEGUEZ C, PINILLA L, TENA-SEMPERE M (2010b) The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci*, **30(23)**:7783-92.
- GIEN J, KINSELLA JP (2011). Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr*, **23**: 305-313.
- GOLDENBERG RL, ANDREWS WW, GOEPFERT AR, FAYE-PETERSEN O, CLIVER SP, CARLO WA, et al. (2008). The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol*;198(1):43–5.
- GOMEZ R, ROMERO R, GHEZZI F, YOON BH, MAZOR M, BERRY SM (1998). The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, **179**: 194-202.
- GONZALEZ R, REINGOLD BK, GAO X, GAIDHU MP, TSUSHIMA RG, UNNIAPPAN S (2011). Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet beta- and MIN6 cells. *Journal of Endocrinology*, **208(3)**:R9-R16.
- GONZALEZ R, SHEPPERD E, THIRUPPUGAZH V, LOHAN S, GREY CL, CHANG JP, UNNIAPPAN S (2012). Nesfatin-1 regulates the hypothalamo-pituitary-ovarian axis of fish. *Biology of Reproduction*, **11;87(4)**:84.

- GONZALEZ R, TIWARI A, UNNIAPPAN S (2009). Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **381(4)**: 643-8.
- GRANCHI D, CENNI E, VERRI E, CIAPETTI G, GAMBERINI S (1998). Flowcytometric analysis of leukocyte activation induced by polyethyleneterephthalate with and without pyrolytic carbon coating. *J Biomed Mater Res*, **39**: 549-53
- GRONECK P, GOETZE-SPEER B, SPEER CP, (1996). Inflammatory bronchopulmonary response of preterm infants with microbial colonisation of the airways at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **74**: F51-5.
- GRONECK P, GOTZE-SPEER B, OPPERMAN M, EIFFERT H, SPEER CHP (1994). Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high risk preterm infants. *Pediatrics*, **93**: 712-718.
- GRONECK P, SPEER CHP (1995). Annotation. *Archives of Disease Childhood*, **73**: F1-F3.
- GUO FF, XU L, GAO SL, SUN XR, LI ZL, GONG YL (2015). The effects of nesfatin-1 in the paraventricular nucleus on gastric motility and its potential regulation by the lateral hypothalamic area in rats. *Journal of Neurochemistry*, **132(3)**:266-275.
- HAIDER DG, PLEINER J, FRANCESCONI M, WIESINGER GF, MULLER M, WOLZT M (2006). Exercise training lowers plasma visfatin concentrations in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **91(11)**: 4702–4704.
- HALLIDAY HL, EHRENKRANZ RA, DOYLE LW (2003). Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD001146.
- HALLMAN M, EPSTEIN BL (1980). Role of myoinositol in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in the lung. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **92**: 1151–1159.
- HALLMAN M, HAATAJA R (2003). Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol*, **8**: 19-27.
- HALVORSEN T, SKADBERG BT, EIDE GE, et al.(2004). Pulmonary outcome in adolescents of extreme preterm birth: a regional cohort study. *Acta Paediatr*, **93(10)**:1294–300.

- HUFTON SE, MOERKERK PT, BRANDWIJK R, DE BRUÏNE AP, ARENDS JW, HOOGENBOOM H (1999). A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett*, **463**: 77-82.
- HUG C, LODISH HF (2005). Visfatin: a new adipokine. *Science*, **307**:366-367.
- IMAI S (2009). The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging--Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. *Cell Biochem Biophys*, **53(2)**: 65-74.
- IQBAL J ve ZAIDI M (2006). TNF regulates cellular NAD⁺ metabolism in primary macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **342(4)**: 1312–1318.
- ISHIDA E, HASHIMOTO K, SHIMIZU H, OKADA S, SATOH T, KATO I, YAMADA M, MORI M (2012). Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. *PLoS One*, 7(12):e50918.
- JANARDHAN K, SANDHU S, SINGH B (2006). Neutrophil depletion inhibits early and late monocyte/macrophage increase in lung inflammation. *Front Biosci*, **11**:1569- 1576.
- JOBE A (2002). Lung development and maturation. In: Fanaroff A and Martin R. Neonatal-perinatal medicine. Disease of the fetus and infant. St Louis, MO: Mosby Inc, 973-991.
- JOBE AH, (2015). Animal models, learning lessons to prevent and treat neonatal chronic lung disease. *Front. Med.* **7**;2: 49. doi: 10.3389/fmed.2015.00049.
- JOBE AH, BANCALARI E (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *Am j Respir Crit Care Med*, **163**: 1723-1729.
- JOBE AH, IKEGAMI M (1998). Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev*, **53(1)**:81–94.
- JOBE AJ, (1999). The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res*, **46(6)**:641–643.
- JOHANSEN C, KRAGBALLE K, RASMUSSEN M, DAM TN, IVERSEN L (2004). Activator protein 1 DNA binding activity is decreased in lesional psoriatic skin compared with nonlesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*, **151**:600-7.
- JONES CA, CAYABYAB RG, KWONG KY, STOTTS C, WONG B, HAMDAN H et al. (1996). Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res*, **39(6)**: 966–975.

- JONSSON B, TULLUS K, BRAUNER A, LU Y, NOACK G (1997). Early increase of TNF α and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child*, **77(3)**:198–201.
- KAJEKAR R, (2007). Environmental factors and developmental outcomes in the lung. *Pharmacol Ther*, **114(2)**:129-145.
- KAKKERA DK, SIDDIQ MM, PARTON LA (2004). Interleukin-1 balance in the lungs of preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonate*, **87(2)**: 82–90.
- KAPLANSKI G, MARIN V, MONTERO-JULIAN F, MANTOVANI A ve FARNARIER C (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*, **24**:25-29.
- KAUKOLA T, TUIMALA J, HERVA R, KINGSMORE S, HALLMAN M (2009). Cord immunoproteins as predictors of respiratory outcome in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol*, **200**: 100.e1–100.e8.
- KEANE MP, STRIETER RM (2002). The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res*; **3**: 5.
- KENDAL CE, BRYANT-GREENWOOD GD (2007). Pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF/Visfatin) gene expression is modulated by NF-kappaB and AP-1 in human amniotic epithelial cells. *Placenta*, **28**: 305-14.
- KENNEDY KA, STOLL BJ, EHRENKRANZ RA, et al.(1997). Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants: has the dose been too low? *Early Hum Dev*, 49:19-31.
- KERSHAW EE, FLIER JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **89**: 2548-2556.
- KILICTURGAY K (1994). İmmunolojiye giriş. 3. basım. Bursa: *Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri*, 72-83.
- KIM J, CHUNG Y, KIM H, IM E, LEE H, YANG H (2014). The tissue distribution of nesfatin-1/NUCB2 in mouse. *Dev Reprod*, **18(4)**: 301–309.
- KIM KC, OPASKAR-HINCMAN H, BHASKAR KR (1989). Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: mucine like glycoproteins, proteoglycans and lipids. *Exp Res*. **15**: 299-314.
- KIM SR, BAE SK, CHOI KS, PARK SY, JUN HO, LEE JY, et al. (2007). Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochem Biophys Res Commun*, **357(1)**: 150-156.

- KIM SR, BAE YH, BAE SK, CHOI KS, YOON KH, KOO TH, et al. (2008). Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1783** (5): 886-895.
- KLIEGMAN RM. (1996). Respiratory tract disorders. In: Nelson EW, Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM editors. Textbook of pediatrics. 15th ed. USA: Wb Saunders Co pp.:467-470.
- KOENIG JM, STEGNER JJ, SCHMECK AC, SAXONHOUSE MA, KENIGSBERG LE (2005). Neonatal neutrophils with prolonged survival exhibit enhanced inflammatory and cytotoxic responsiveness. *Pediatr Res*, **57**: 424-429.
- KORVENRANTA, E, LEHTONEN L, PELTOLA M, HAKKINEN U, ANDERSSON S, GÜSSLER M, LEIPÄLÄ J, RAUTAVA L, TAMMELA O, LINNA M, (2009). Morbidities and hospital resource use during the first 3 years of life among very preterm infants. *Pediatrics*, **124**(1): 128-134. doi:10.1542/peds.2008-1378.
- KOTECHA S (2000). Pathophysiology of chronic lung disease of prematurity. *Biol Neonate*, **78**: 233-68.
- KOTECHA S, CHAN B, AZAM N, SILVERMAN M, SHAW RJ (1995). Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage of premature infants with chronic lung disease. *Arch Dis Child*, **72**: F90 - F96.
- KOTECHA S, SILVERMAN M, SHAW RJ et al. (1998). Soluble L-selectin concentration in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants who develop chronic lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **78**:143-147.
- KOTECHA S, WILSON L, WANGOO A, SILVERMAN M, SHAW RJ, (1996). Increase in interleukin (IL)-1 α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res*; **40**(2): 250-256.
- KONCZOL K, PINTER O, FERENCZI S, VARGA J, KOVACS K, PALKOVITS M, ZELENÁ D, TOTTH ZE (2012). Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *International Journal of Obesity*, **36**: 1514-1521.
- KORNER A, GARTEN A, BLUHER M, TAUSCHER R, KRATZSCH J, KIESS W (2007). Molecular characteristics of serum visfatin and differential detection by immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**: 4783-91.
- KUKLA M, MAZUR W, BULDAK RJ, ZWIRSKA-KORCZALA K (2011). Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines--visfatin, chemerin and vaspin--in chronic hepatitis. *Mol Med*, **17**(11-12): 1397-410.

- KUWANO K, HAGIMOTO N, KAWASAKI M, YATOMI T, NAKAMURA N, NAGATA S, SUDA T, KUNITAKE R, MAEYAMA T, MIYAZAKI H, HARA N (1999). Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, **104**:13-19.
- KULTURSAY N, (2003). Fetal ve neonatal proenflamatuar sitokin yanıtı-perinatal beyin ve akciğer zedelenmesi ile ilişkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **46**: 299-307.
- KWONG KYC, JONES CA, CAYABYAB R, LECART C, KHUU N, RHANDHAWA I, et al. (1998). The effects of IL-10 on proinflammatory cytokine expression (IL-1b and IL-8) in hyaline membrane disease (HMD). *Clin Immunol Immunopathol*, **88(1)**:105–113.
- LAVOIE, PM, PHAM C, JANG KL (2008). Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health. *Pediatrics*, **122(3)**: 479-485. doi:10.1542/peds.2007-2313; 10.1542/peds.2007-2313.
- LEMONS JA, BAUER CR, OH W, KORONES SB, PAPILE L-A, STOLL BJ, VERTER J, TEMPROSA M, WRIGHT LL, EHRENKRANZ RA, FANAROFF AA, STARK A, CARLO W, TYSON JE, DONOVAN EF, SHANKARAN S, STEVENSON DK (2001). Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics*, 107:e1.
- LEVINE CR, GEWOLB IH, DAVIS JM, et al. (2005). The safety, pharmacokinetics, and anti-inflammatory effects of intratracheal recombinant human Clara cell protein in premature infants with respiratory distress syndrome. *Pediatr Res*, **58**: 15-21.
- LI YH, TULLUS K (2002). Microbial infection and inflammation in the development of chronic lung disease of prematurity. *Microbes Infect*, **4**:723-732.
- LIM SY, DAVIDSON SM, PARAMANATHAN AJ, SMITH CC, YELLON DM, HAUSENLOY DJ (2008). The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects. *J Cell Mol Med*, **12(4)**: 1395-403.
- LIU P, LI H, CEPEDA J, ZHANG LQ, CUI X, GARCIA JG, YE SQ, (2009). Critical role of PBEF expression in pulmonary cell inflammation and permeability. *Cell Biology International*, **33(1)**: 19–30.
- LOMONACO MB, BARBER CM, SINKIN RA, (1996). Differential cytokine mRNA expression by neonatal pulmonary cells. *Pediatr Res*, **39(2)**: 248–251.
- LONGO ML, BISANGO AM, ZASADNISKI JAN, BRUNI R, WARING AJ (1993). A function of lung surfactant protein Sp-B. *Science*, **261**:453-456.

- LOVREN F, PAN Y, SHUKLA PC, QUAN A, TEOH H, SZMITKO PE, et al. (2009). Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo: translational implications for atherosclerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296(6)**: E1440-9.
- LU LF, YANG SS, WANG CP, HUNG WC, YU TH, CHIU CA et al. (2009). Elevated visfatin/pre-B-cell colonyenhancing factor plasma concentration in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, **18(5)**: 354-359.
- LUK T, MALAM Z, MARSHALL JC, (2008). Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, **83(4)**: 804–816, 2008.
- LUNDSTROM KE, SHAW NJ, THOMSON MA, (2000). Chronic lung disease-cracking the condition in the 21st century. *Biol Neonate*, **78(3)**: 233–268.
- MABANTA CG, PRYHUBER GS, WEINBERG GA, PHELPS DL (2003). Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with *Ureaplasma urealyticum*. *Cochrane Database Syst Rev*, **(4)**:CD003744.
- MADURGA A, MIZIKOVA I, RUIZ-CAMP J, et al. (2013). Recent advances in late lung development and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **305(12)**: L893–905.
- MAEDA Y, DAVE V AND WHITSETT JA (2007). Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev*, **7**: 219-244.
- MAHIEU LM, DE DOOY JJ, IEVEN MM, et al. (2005). Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and decreased levels of interleukin-12 p70 in tracheal aspirates, within 2 hrs after birth, are associated with mortality among ventilated preterm infants. *Pediatr Crit Care Med*, **6**: 682-9.
- MARIEB E. (2001). The respiratory system. In: Marieb E. Human anatomy & physiology. San Francisco. Addison Wesley Longman, Inc, 834-886.
- MARTIN JA, HAMILTON BE, OSTERMAN MJK, DRISCOLL AK, DRAKE P, (2018). Births: Final Data For 2016. *National vital statistics reports*, **67(1)**:1-55.
- MARTIN PR, SHEA RJ, MULKS MH (2001). Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *J Bacteriol*; **183(4)**: 1168-74.
- MASMONTEIL TL, (1993). Pulmonary surfactant proteins. *Crit Care Med*. **21**: 376-379.

- MAY M, MARX A, SEIDENSPINNER S, SPEER CP (2004). Apoptosis and proliferation in lungs of human fetuses exposed to chorioamnionitis. *Histopathology*, **45**: 283-290.
- MAY M, STROBEL P, SEIDENSPINNER S, MARX A, SPEER CP (2004). Apoptosis and proliferation in lungs of stillborn fetuses and ventilated preterm infants with respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*, 23:113-121.
- MCEVOY CT, JAIN L, SCHMIDT B, ABMAN S, BANCALARI E, ASCHNER JL, (2014). Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI workshop on the primary prevention of chronic lung diseases. *Ann. Am. Thorac. Soc*, Suppl **3**:S146-53. doi: 10.1513/AnnalsATS.201312-424LD.
- MCGOWAN EC, KOSTADINOV S, MCLEAN K, GOTSCH F, VENTURINI D, ROMERO R, LAPTOOK AR, SHARMA S (2009). Placental IL-10 dysregulation and association with bronchopulmonary dysplasia risk. *Pediatr Res*, **66**: 455–460.
- MCGUIRK P VE MILLS KHG (2000). A Regulatory Role for Interleukin 4 in Differential Inflammatory Responses in the Lung following Infection of Mice Primed with Th1- or Th2-Inducing Pertussis Vaccines. *INFECTION IMMUN*, 68(3):1383–1390.
- MERALI Z, CAYER C. (2008). Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, **201(1)**:115-23.
- MEYER S, GORTNER L (2014). NeoVitA Trial Investigators. Early postnatal additional high- dose oral vitamin A supplementation versus placebo for 28 days for preventing bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Neonatology*, **105**:182-188.
- MOBIUS MA, THEBAUD B (2017). Bronchopulmonary Dysplasia-Where have all the Stem Cells gone? Origin and (potential) function of resident lung stem cells. *Chest*, 152(5):1043-1052.
- MORTON KA, HARGREAVES L, MORTAZAVI S, WEBER LP, BLANCO AM, UNNIAPPAN S (2018). Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*, **65**: 56-66.
- MOSCHEN AR, KASER A, ENRICH B, MOSHEIMER B, THEURL M, NIEDEREGGER H, TILG H, (2007). Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *Journal of Immunology*, **178(3)**: 1748– 1758.
- MOSS TJ, NEWNHAM JP, WILLETT KE, KRAMER BW, JOBE AH, IKEGAMI M (2002). Early gestational intra-amniotic endotoxin: lung function, surfactant, and morphometry. *Am J Respir Crit Care Med*, **165(6)**:805-11.

- MUHUMUZA CK, RODRIGUEZ A, FAIRCHILD KD et al. (2004). Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants. *Pediatr Res*, **55**: 1009-1017.
- MUKAIDA N, HORADO A, MATSUSHIMO K (1995). A novel leukocyte chemotactic and activating cytokine, interleukin-8 (IL-8). *Cancer Treat Res*, **80**: 261-86.
- MUNSHI UK, NIU JO, SIDDIING MM, PATRON LA (1997). Evaluation of interleukin-8 and interleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*, **24(5)**: 331-336.
- MURCH SH, COSTELOE K, KLEIN NJ, REES H, MCINTOSH N, KEELING JW, MACDONALD TT (1996). Mucosal tumor necrosis factor-alpha production and extensive disruption of sulfated glycosaminoglycans begin within hours of birth in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Res*, **40(3)**:40: 484-489.
- MURCH SH, COSTELOE K, KLEIN NJ, REES H, MCINTOSH N, KEELING JW, MACDONALD TT (1996). Mucosal tumor necrosis factor-alpha production and extensive disruption of sulfated glycosaminoglycan begin within hours of birth in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Res*, **40(3)**:484-492.
- MUSCEDERE JG, MULLEN JBM, GAN K, SLUTSKY AS (1994). Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, **149**: 1327-1334.
- NAIR, S, ZINGDE, SM (2001). Adhesion of Neutrophils to Fibronectin: Role of the CD66 Antigens. *Cell Immunol*, **208**: 96-106.
- NAKATA M, MANAKA K, YAMAMOTO S, MORI M, YADA T (2011). Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet beta-cells. *Endocrine Journal*, **58**: 305-313.
- NATARAJAN G, PAPPAS A, SHANKARAN S, KENDRICK DE, DAS A, HIGGINS RD, LAPTOOK AR, BELL EF, STOLL BJ, NEWMAN N, HALE EC, BARA R, WALSH MC (2012). Outcomes of extremely low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia: Impact of the physiologic definition. *Early Human Development*, **88(7)**:509-515. doi:10.1016/j.earlhumdev.2011.12.013.
- NORTHWAY WH JR (1990). Bronchopulmonary dysplasia: then and now. *Archives of Disease in Childhood*, **65**: 1076-1081.
- NORTHWAY WH JR, ROSAN RC, PORTER DY (1967). Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline membrane disease: Bronchopulmonary dysplasia. *New Engl J Med*, **276**: 357-68.

- O'SHEA TM, KOTHADIA KJ, KLINEPETER KL, et al. (1999). Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. *Pediatrics*, **104**: 15-21.
- O'BRIEN AD, STANDIFORD TJ, CHRISTENSEN PJ, WILCOXEN SE and PAINE R (1998). Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *J Lab Clin Med*, **131**:417-424.
- OGNJANOVIC S, BRYANT-GREENWOOD GD, (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *The American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **187(4)**: 1051–1058, 2002.
- OGNJANOVIC S, BAO S, YAMAMOTO SY, GARIBAY-TUPAS J, SAMAL B, et al. (2001). Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, **26**: 107–117.
- OH-I S, SHIMIZU H, SATOH T, OKADA S, ADACHI S, INOUE K, EGUCHI H, YAMAMOTO M, IMAKI T, HASHIMOTO K, et al. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, **443(7112)**:709-12.
- OUCHI N, PARKER J.L, LUGUS, JJ, WALSH K (2011). Adipokinesin inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, **11(2)**: 85–97.
- OZCAN M, BETUL ZG, EMİNE K, SERHATLIOĞLU I & KELEŞTİMUR H (2016). Nesfatin-1 increases intracellular calcium concentration by protein kinase C activation in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters*, **619**: 177–181.
- OZDEMIR R, ERDEVE O, DIZDAR EA, et al. (2011). Clarithromycin in preventing bronchopulmonary dysplasia in Ureaplasma urealyticum-positive preterm infants. *Pediatrics*, **128(6)**: e1496-501.
- OZKAN H, KOKSAL N, CETINKAYA M, CANITEZ Y. (2008). Risk Factors for Bronchopulmonary Dysplasia. *Güncel Pediatri*, **6**: 66-71.
- OZSAVCI D., ERSAHIN M. (2011). The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery*, **68:6**:1699–1708.
- PAANANEN R, HUSA AK, VUOLTEENAHO R, HERVA R, KAUKOLA T, HALLMAN M (2009). Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr*, **154(1)**:39-43.
- PALASZ A, KRZYSTANEK M, WORTHINGTON J, CZAJKOWSKA B, KOSTRO K, WIADERKIEWICZ R, BAJOR G (2012) Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, **46**: 105–112.

- PEIRO C, ROMACHO T, CARRARO R, SANCHEZ-FERRER C (2010). Visfatin/PBEF/Nampt: A New Cardiovascular Target? *Front Pharmacol*, **1**:1-7.
- PILZ S, MANGGE H, OBERMAYER-PIETSCH B, MARZ W (2007). Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor: a protein with various suggested functions. *J Endocrinol Invest*, **30**: 138-44.
- POINTDEXTER BB, FENG R, SCHMIDT B, ASCHNER JL, BALLARD RA, HAMVAS A, et al. (2015). Comparisons and limitations of current definitions of bronchopulmonary dysplasia for the prematurity and respiratory outcomes program. *Ann Am Thorac Soc*, **12**:1822-1830.
- POSSMAYER F, (1990). The role of surfactant associated proteins. *AM Rev Respir Dis*, **142**:749-752.
- POSTLETHWAITE AE, HOLNESS MA, KATAI H, RAGHOW R (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin-4. *J Clin Invest*, **90**: 1479-1485.
- PRINZ P, GOEBEL-STENGEL M, TEUFFEL P, ROSE M, KLAPP BF, STENGEL A. (2016). Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 470(3):521–527.
- RAMANJANEYA M, CHEN J, BROWN JE, TRIPATHI G, et al. (2010). Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*, **151**(7): 3169–3180.
- RINDFLEISCH MS, HASDAY JD, TACIAK V, BRODERICK K, VISCARDI RM, (1996). Viscardi RM. Potential role of interleukin-1 in the development of bronchopulmonary dysplasia. *J Interferon Cytokine Res*; **16**(5):365–373.
- RICH EA (1990). Pulmonary surfactant as a physiologic immunosuppressive agent. *J Lab Clin Med*, **116**: 4-5.
- RIVA M, NITERT MD, VOSS U, SATHANOORI R, LINDQVIST A, LING C, WIERUP N (2011). Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res*, **346**(3):393–405.
- ROBERTS FJ, WEESNER KM, BUCHER RJ (1983). Oxygen-induced alterations in lung vascular development in the newborn rat. *Pediatr Res*, **17**:368-375.
- ROJAS MA, GONZALEZ A, BANCALARI E, CLAURE N, POOLE C, SILVA-NETO G, (1995). Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr*, **126**: 605-610.

- ROZYCKI HJ, COMBER PG, HUFF TF, (2002). Cytokines and oxygen radicals after hyperoxia in preterm and term alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282**: L1222-8.
- RUSSELL GA, COOKE RW (1995). Randomised controlled trial of allopurinol prophylaxis in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **73**: F27-31.
- SADDI-ROSA P, OLIVEIRA CS, GIUFFRIDA FM, REIS AF (2010). Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol Metab Syndr*, **2(21)**: 1-6.
- SAMAL B, SUN Y, STEARNS G, XIE C, SUGGS S, MCNIECE I (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular & Cellular Biology*, **14(2)**: 1431-1437.
- SAMAL B, SUN Y, STEARNS G, XIE C, SUGGS S, MCNIECE I (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, **14(2)**: 1431-7.
- SAMAL B, SUN Y, STEARNS G, XIE C, SUGGS S, MCNIECE I (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colonyenhancing factor. *Mol. Cell. Biol*, **14(2)**:1431-1437.
- SCHILLING E, HAUSCHILDT S (2012). Extracellular ATP induces P2X7-dependent nicotinamide phosphoribosyltransferase release in LPS-activated human monocytes. *Innate Immun*, **18(5)**: 738-44.
- SCHMIDT B, CAO L, MACKENSEN-HAEN S, KENDZIORRA H, KLINGEL K, SPEER CP, (2001). Chorioamnionitis and inflammation of the fetal lung. *Am J Obstet Gynecol*, **194**: 173-177.
- SCHMIDT B, ROBERTS R, MILLAR D, KIRPALANI H, (2008). Evidence-based neonatal drug therapy for prevention of bronchopulmonary dysplasia in very-lowbirth-weight infants. *Neonatology*, **93(4)**: 284-287.
- SCHMIDT B, ROBERTS RS, DAVIS P, et al. (2006). Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med*, **354(20)**:2112-2121.
- SCHOCK BC, SWEET DG, ENNIS M, WARNER JA, YOUNG IS, HALLIDAY HL (2001). Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies. *Pediatr Res*, **50**: 29-33.
- SERASANAMBATI W, CHILAKAPATI SR, (2016). Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) in human diseases- A Review. *South Indian Journal Of Biological Sciences*, **2(4)**: 368-387.

- SHAHZAD T, RADAJEWSKI S, CHAO CM, BELLUSCI S VE EHRHARDT H (2016). Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development. *Molecular and Cellular Pediatrics*, **3**:23.
- SHIMIZU H, OH-I S, OKADA S & MORI M (2009) Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocrine Journal*, **56(4)**:537-43.
- SHIMOTAKE TK, IZHAR FM, RUMILLA K, LI J, TAN A, PAGE K, et al. (2004). Interleukin (IL)-1b in tracheal aspirates from premature infants induces airway epithelial cell IL-8 expression via an NF-kB dependent pathway. *Pediatr Res*, **56**: 907-913.
- SIGRIST S, THOMAS D, HOWELL S, et al. (1982). The effect of aminophylline on inspiratory muscle contractility. *Am Rev Respir Dis*, **126 (1)**: 46- 50.
- SINGH G, SINGH J, KATYAL SL, BROWN WE, KRAMPS JA, PARADIS IL, DAUBER JH, MACPHERSON TA AND SQUEGLIA N (1988). Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein. *J Histochem Cytochem*, **36**:73-80.
- SLY PO, HAYDEN MJ, PETAK F, HANTOS Z (1996). Measurement of low-frequency respiratory impedance in infants. *Am J Respir Crit Care Med*, **154**: 161-166.
- SMITH DR, KUNKEL SL, STANDIFORD TJ, et al. (1995). Increased interleukin-1 receptor antagonist in idiopathic pulmonary fibrosis. A compartmental analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, **151**:1965-1973.
- SMYTH JA, TABACHNIK E, DUNCAN WJ, REILLY BJ, LEVISON H (1981). Pulmonary function and bronchial hyperreactivity in long-term survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, **68**: 336-340.
- SOMMER G, GARTEN A, PETZOLD S, BECK-SICKINGER AG, BLUHER M, STUMVOLL M, et al (2008). Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clin Sci (Lond)*, **115(1)**: 13-23.
- SPEER CP (1999). Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease. *Eur J Pediatr*, **158 Suppl1**:518-522.
- SPEER CP (2001). New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate*, **79**: 205-209.
- SPEER CP. (2006). Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: A continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med*, **11**: 354-362.
- STARK AR, CARLO W, TYSON JE, et al. (2001). Adverse effects of early dexamethasone treatment in extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med*, **344**: 95-101.

- STEAYER DS, YANG S, JERNG HH (1993). Surfactant protein A binding proteins. *J Biol Chem*, **268**:18678-18684.
- STENGEL A, GOEBEL M, YAKUBOV I, WANG L, WITCHER D, COSKUN T, TACHÉ Y, SACHS G, LAMBRECHT NW (2009). Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, **150(1)**:232-238.
- STENGEL A., TACHE Y (2010). Nesfatin-1 role as possible new potent regulator of food intake. *Regul Pept*, **9;163(1-3)**:18-23.
- STENMARK KR, VOELKEL NF (1988). Potential role of inflammation and lipid mediators in the pathogenesis and pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia. In: Bancalari E, Stocker JT, eds. Bronchopulmonary dysplasia. Washington, DC: *Hemisphere Publishing Corporation*, 59-77.
- STEVENSON DK, WRIGHT LL, LEMONS JA, OH W, KORONES SB, PAPILE LA, BAUER CR, STOLL BJ, TYSON JE, SHANKARAN S, et al. (1998). Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol*, **179**:1632–1616.
- STEWART A, BRION LP (2011). Intravenous or enteral loop diuretics for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **7;(9)**: CD001453.
- STOFKOVA A (2010). Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocr Regul*, **44(1)**: 25-36.
- STOLL BJ, HANSEN NI, BELL EF, WALSH MC, CARLO WA, SHANKARAN S et al. (2015). Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *Jama*, **314(10)**: 1039-1051. doi:10.1001/jama.2015.10244.
- TAGHIZADE A, REYNOLDS EO (1976). Patogenezis of Bronchopulmonary dysplasia following hyaline membrane disease. *Am J Pathol*, **82**: 241-264.
- TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T, (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **6(10)**: a016295.
- TANG CH, FU XJ, XU XL, WEI XJ, PAN HS, (2012). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides*, **36(1)**:39–45.
- TANIDA M, GOTOH H, YAMAMOTO N, WANG M, KUDA Y, KURATA Y, MORI M, SHIBAMOTO T (2015). Hypothalamic nesfatin-1 stimulates sympathetic nerve activity via hypothalamic ERK signaling. *Diabetes*, **64(11)**:3725-3736.

- THEBAUD B, KOUREMBANAS S (2017). Can we cure bronchopulmonary dysplasia? *J Pediatr*, **191**: 12-14.
- THOMAS W, SPEER CP (2005). Management of infants with bronchopulmonary dysplasia in Germany. *Early Human Development*, **81**: 155-163.
- THOMPSON A, BHANDARI V (2008). Pulmonary biomarkers of bronchopulmonary dysplasia. *Biomark Insights*, **3**:361–73.
- TSIOTRA PC, TSIGOS C, YFANTI E, ANASTASIOU E, VIKENTIOU M, PSARRA K et al. (2007). Visfatin, TNF-alpha and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm Metab Res*, **39**:758-63.
- TSUDA A, IKEGAMI T, HIRANO H, et al. (1998).The relationship between amniotic fluid interleukin-6 concentration and histologic evidence of chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **77**: 515-20.
- TYSON JE, WRIGHT LL, OH W, et al. (1999). Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Engl J Med*, **340**:1962-1968.
- TYSON JE, WRIGHT LL, OH W, KENNEDY KA, MELE L, EHRENKRANZ RA, et al. (1999). Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med*, **340(25)**:1962-1968.
- VAN BEIJNUM JR, MOERKERK PT, GERBERS AJ, DE BRUINE AP, Arends JW, Hoogenboom HR, et al. (2002). Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: a study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *Int J Cancer*, **101**: 118-127.
- VAN MARTER LJ, DAMMANN O, ALLRED EN, et al.(2002).Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr*, **140**: 171-176.
- VAN MARTER LJ, LEVITON A, ALLRED EN, et al. (1990). Hydration during the first days of life and the risk of bronchopulmonary dysplasia in low birth weight infants. *J Pediatr*, **116(6)**: 942-9.
- WAGENAAR GT, TER HORST SA, VAN GASTELEN MA, LEIJSER LM, MAUAD T, VAN DER VELDEN PA, et al. (2004). Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **36**: 782-801.
- WANG P, VANHOUTTE PM, MIAO CY (2012). Visfatin and cardiocerebrovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, **59(1)**: 1-9.

- WANG P, XU TY, GUAN YF, TIAN WW, VIOLLET B, RUI YC, et al (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway. *Ann Neurol*; **69(2)**: 360-74.
- WARNER BB, STUART LA, PAPES RA, WISPE JR, (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol*, **275**: L110-7.
- WATTERBERG KL, GERDES JS, GIFFORD KL, LIN HM (1999). Prophylaxis against early adrenal insufficiency to prevent chronic lung disease in premature infants. *Pediatrics*, **104**: 1258-1263.
- WATTERBERG KL, SCOTT SM (1995). Evidence of early adrenal insufficiency in babies who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, **95**: 120-125.
- WEIRICH E, RABIN RL, MALDONADO Y, et al. (1998). Neutrophil CD11b expression as diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr*, **132**: 445-451.
- WELTY SE (2000). Is oxidant stress in the causal pathway to bronchopulmonary dysplasia? *NeoReviews*, **1**: 6-10.
- WERNECKE K, LAMPRECHT I, JOHREN O, LEHNERT H, SCHULZ C (2014). Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity*, **22(7)**:1662-1668.
- WIRTZ H, SCHMIDT M (1992). Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin Invest*, **70**: 3-13.
- WRIGHT JR, YOUMANS DC. (1993). Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol*, **264**:338-344.
- WRIGHT JR, HAWGOOG S (1989). Pulmonary surfactant metabolism. *Clin Chest Med*, **10**: 82-93.
- YAMADA M, HORIGUCHI K, UMEZAWA R, HASHIMOTO K, SATOH T, OZAWA A, SHIBUSAWA N, MONDEN T, OKADA S, SHIMIZU H. AND MORI M (2010) Troglitazone, a Ligand of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , Stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by Activating the ERK1/2 Pathway: Isolation and Characterization of the Human NUCB2 Gene. *Endocrinology*, **151**: 2494–2503.
- YE SQ, SIMON BA, MALONEY JP, ZAMBELLI-WEINER A, et al. (2005). Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **171(4)**: 361–370.

- YODER BA, COALSON JJ, WINTER VT, SILER-KHODR T, DUFFY LB, CASSELL GH (2003). Effects of antenatal colonization with *Ureaplasma urealyticum* on pulmonary disease in the immature baboon. *Pediatr Res*, **54**:797-807.
- YOON BH, ROMERO R, JUN JK, et al. (1997). Amniotic fluid cytokines (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, **177**: 82530.
- YOSTEN G.L, SAMSON WK (2009) Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**(2): R330-6
Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724238/>
Erişim tarihi: 25.04.2020.
- YOSTEN GL, SAMSON WK (2010) The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **298**(6):R1642-7.
- YU XY, QIAO SB, GUAN HS, LIU SW, MENG XM (2010). Effects of visfatin on proliferation and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Horm Metab Res*, **42**(7): 507-13.
- ZHANG LQ, HERUTH DP, YE SQ (2011). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases. *J Bioanal Biomed*, **7**(3): 13-25.
- ZHOU L, LIM L, COSTA RH AND WHITSETT JA (1996). Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3 β , surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem*, **44**:1183-1193.

EKLER

Ek-1. Klinik Araştırma Etik Kurul Raporu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU						
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Bronkopulmoner Displazi Hastalarında Çeşitli Adipositokin Düzeyleri ve Enflamatuvar Mikroçevre İlişkisinin Araştırılması				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU						
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tariki	Yürüyen Numarası	Dil		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER	<input type="checkbox"/>					
KARAR BELGELERİ	Karar No:07-533-19		Tarih:08 Nisan 2019			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırma/çalışmanın gerektireceği amaç, yöntemi ve yöntemleri dâhile olarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırma/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına taplanıyor kararı ile karar verilmiştir.					
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Mehmet MELLİ				
Unvanı/Adı/Soyadı	Ülmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma İle İlgili	Karar	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr. İnan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>İnan Soykan</i>
Prof.Dr. Sander ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Sander Öztürk</i>
Prof.Dr. Levent YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Levent Yazıcıoğlu</i>
Prof. Dr. Şahin ŞENOL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Şahin Şenol</i>
Prof. Dr. İsmail İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İsmail İlhan</i>
Prof. Dr. Serap SIVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Serap Sivri</i>
Prof. Dr. Zeynep ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü. Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Zeynep Şenocak</i>
Prof. Dr. Recep ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Recep Çakır</i>
Doç. Dr. Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Derya Gökmen</i>
Doç. Dr. Selami Kaçak TOPRAK	Herpetoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Selami Kaçak Toprak</i>
Doç. Dr. Pinar HUKİ	Biyoetik/Mühendislik	A.Ü. Mühendislik Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pinar Hüki</i>
Dr. Öğr. Üyesi Nüket KUTLAY	Tabii Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Nüket Kutlay</i>
Dr. Öğr. Üyesi Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Önder İlgili</i>
İfrah BERKTAŞ	Matematik/Mühendislik	Türkiye Köstürge İhtisasları Genel Müdürlüğü	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>İfrah Berktaş</i>
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ		<i>M. Mellî</i>			Berna İŞİK Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Aslı Übedir	
İmza:						
Not: Etik kurul başkanı, imzasını yer almadığı her sayfaya imza atmamalıdır.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Bronkopulmoner Displazi Hastalarında Çeşitli Adipositokin Düzeyleri ve Enflamatuvar Mikroçevre İlişkisinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Filiz BAKAR ATEŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
	Diğer ise belirtiniz: Vaka-Kontrol Araştırması				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	
	ULUSAL	<input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî

Berna İŞİK
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Aslı Gıbyır

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı	Berna
Soyadı	Hoti
Doğum yeri ve tarihi	Prizren / 20.04.1985
Uyruğu	Kosova
Medeni Durumu	Bekar
İletişim Adresi ve telefonu	ecz.bernahoti@gmail.com / 0553 690 86 84

II-Eğitimi

Doktora: Ankara Üniversitesi Sağlık
Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim
Dalı (2016-...)

Yüksek isans: Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik
Eczacılık Anabilim Dalı Klinik
Eczacılık (2010-2015) ANKARA

Üniversite: Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi (2005-2010)
ANKARA

Lise: “Gjon Buzuku” Fen-Matematik
Lisesi (2000-2004) Prizren/KOSOVA

İlkokul ve ortaokul: “Abdyl Frasheri”
(1992-2000) Prizren/KOSOVA

Yabancı Diller

Arnavutça
İngilizce

III-Ünvanları

Eczacı- 2010

Uzman Eczacı- 2015

IV-Mesleki Deneyimi

2016-... Türk Eczacıları Birliği
Planlama ve Koordinasyon Uzmanı

2015: Türk Eczacıları Birliği TEBRP
birim eczacısı

2013-2015: Ankara Üniversitesi Tıp
Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma
Hastalıkları Bilim Dalı, Klinik Staj

2012-2014: Türk Eczacıları Birliği
İktisadi İşletmesi – İthal İlaç Birimi,
stajyer eczacı

2010-2011: Türk Eczacıları Birliği
TEBEOS/TEBRP, stajyer eczacı

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar -

VI-Bilimsel İlgi Alanları

Arif Ahmet Başaran, İlkay Erdoğan Orhan,
Bensu Karahalil, Ayşe Nurşen Başaran.
Berna Hoti. Türk Eczacıları Birliği
Yayınları Tıbbi Bitkisel Ürünler El Kitabı.
Temmuz, 2019.

Figen Tırnaksız, Ayşegül Karataş, Nilüfer Tarımcı, Füsün Acartürk, Nevin Çelebi, Ceyda Akkuş Aslan, Fatmanur Tuğcu Demiröz, Sibel İlbasmış Tamer, Aslıhan H.Algan, Berna Hoti. Türk Eczacıları Birliği Yayınları “Majistral İlaç Rehberi” Haziran, 2015

Melike Sucu, Berna Hoti, Tuğba Günbatan, Filiz Bakar-Ateş, İlhan Gürbüz, Erdal Bedir, Hayri Duman, Ceyda Sibel Kılıç (2019). Cytotoxicity Guided Fractionation Studies on Ferulago Syriaca Roots Against Various Cancer Cell Lines, pp: 169, The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, April 24-26, 2019, Cappadocia, Turkey.

Elif Dilmaç, Berna Hoti, Tuğba Günbatan, Filiz Bakar-Ateş, İlhan Gürbüz, Erdal Bedir, Hayri Duman, Ceyda Sibel Kılıç (2019). Cytotoxicity Guided Fractionation Studies on Ferulago Macrosciadia Roots Against A549, MCF-7, PC3 and SW480 Cancer Cell Lines, pp: 170, The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, April 24-26, 2019, Cappadocia, Turkey

Filiz Bakar-Ates¹, Berna Hoti¹, İlhan Gurbuz², Tugba Gunbatan², Hayri Duman³, Ceyda Sibel Kilic⁴ (2020). The cytotoxic and apoptotic effects of Ferulago W. Koch extracts on various cancer cell lines. *Turkish Journal of Biochemistry*, doi:10.1515/tjb-

2020-0225

VII-Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar

Millî Eğitim Bakanlığı Bursu (Lisans Eğitimi Dönemi)

Ödüller

Türk Eczacıları Birliği II.Bölge Ankara Eczacı Odası Başarı Belgesi (14.05.2016)

Projeleri

Tedavide Kullanımda Olan Antikolinergik İlaç (Spazm Giderici ve Ağrı Kesici) Kombinasyonlarında Kullanılan Etken Maddeler Ve Kimyasal Yapıları (Prof.Dr. Doğu NEBİOĞLU danışmanlığında lisans eğitimi araştırma projesi)

VIII-Diğer Bilgiler

Stajlar

Eczane Stajı “Lokman Hekim” Eczanesi – İstanbul (23.06.2008 – 23.07.2008)

Eczane Stajı “Dizdari Eczanesi” Prizren (25.07.2008 – 08.09.2008)

Eczane Stajı “Dizdari Eczanesi” Prizren (01.07.2009 – 17.08.2009)

Ankara Üniversitesi İbn-İ Sina Hastanesi Hastane Eczanesi Stajı (15.02.2010 – 15.04.2010)

Ankara Üniversitesi İbn-İ Sina Hastanesi Kardiyoloji ABD, Endokrinoloji ABD,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci
Hastanesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji
ABD,Klinik Staj (02/2011 – 05/2011)

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci
Hastanesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji
ABD, Klinik Staj (10/2011 – 12/2011)

Eğitim ve Seminerler

English course Go-1, Prizren
English Course Go-3, Prizren (26.06.2000)

Pre Intermediate – Lower Secondary –
Junior Learners (13.06.2001)

English Blueprint Intermediate, Prizren
(25.06.2002)

MS Exel & Microsoft Office Word 2000 &
Powerpoint, Prizren (04.08.2000 -
26.09.2000)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Temel İlk Yardım” Eğitimi (06. – 07 Mart
2010)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Kozmetik/Dermokozmetik” meslek içi
eğitim semineri (27 -28 Mart 2010)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi

“Diyabet” meslek içi eğitim semineri
(04/2010)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Romatizmal Hastalıklar/Artrit”
Meslek İçi Eğitim Semineri (29.05.2010)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Koroner arter hastalıklarında eczacının
rolü” Meslek İçi Eğitim Semineri
(26.06.2010)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“İyi Eczacılık Uygulamaları-Klinik
Eczacılık- Farmasötik Bakım”
Meslek İçi Eğitim Semineri (02/2011)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Eczane Yönetimi” Meslek İçi Eğitim
Semineri (26.02.2011)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Danışman Eczacı” Meslek İçi Eğitim
Semineri (27.02.2011)

Türk Eczacıları Birliği 11. Türkiye
Eczacılık Kongresi (18 – 21 Ekim
2012)

Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi
“Eczacılık İşaret Dili Kursu” (19.01.2013)

Türk Eczacıları Birliği
Seçim OSGB İş Sağlığı ve Güvenliği

Genel Kuralları ve Güvenlik Kültürü
Eğitimi 21.12.2017)

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel
Müdürlüğü
“Böbrek Hastalıklarına Yönelik Sağlık
Personeli İçin Eğitim Materyali Hazırlama
alıştayı” (15-16.10.2018)

Türk Eczacıları Birliği 14.Türkiye Eczacılık
Kongresi (1-3.11.2018)

T.C. Sağlık bakanlığı Dr. Abdurrahman
Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim Ve
Araştırma Hastanesi “II.Kapsamlı Kanser
Merkezlerinde Klinik Eczacılık
Sempozyumu” (6.11.2018)

Türk Eczacıları Birliği Gençlik Komisyonu
II.Ulusal Kongresi (22-24.02.2019)

Türk Eczacıları Birliği Uluslararası
Eczacılık Federasyonu Bölgesel Konferansı
(23-25.10.2019)