



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PLASENTAL APOPTOZİSİN ZAMANINDAN ÖNCE  
DOĞAN BEBEKLERDE KLİNİK DURUM VE  
PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Ayşe Bozkurt TURHAN  
UZMANLIK TEZİ

Danışman  
Prof.Dr. Aytuğ ATICI

MERSİN-2004

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

**PLASENTAL APOPTOZİSİN ZAMANINDAN ÖNCE  
DOĞAN BEBEKLERDE KLİNİK DURUM VE  
PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Ayşe Bozkurt TURHAN  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman  
Prof.Dr. Aytuğ ATICI**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP 1407).

**MERSİN-2004**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmem için emek harcayan bütün hocalarıma en içten duygularla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında desteğini hissettiğim Prof. Dr. Aytuğ Atıcı'ya, ayrıca katkılarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Ayşe Polat ve çalışma arkadaşlarına, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Özlem Pata ve çalışma arkadaşlarına, Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Arzu Kanık, araştırma görevlisi İlter Helvacı ve çalışma arkadaşlarına, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına, mesai arkadaşlarıma ve hastalarımıza teşekkürü bir borç biliyorum.

Yaşamımın her döneminde sevgi ve katkılarını hissettiğim sevgili aileme ve desteği için eşime yürekten teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	7
GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
GENEL BİLGİLER.....	11
Apoptozisin Tanımı.....	11
İnsan Organizmasında Apoptozisin İzlendiği Durumlar.....	11
Apoptozis ve Nekrozis.....	14
Apoptozisin Biyokimyasal Özellikleri.....	17
Apoptoziste Hücre Ölüm Aşamaları.....	18
Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	22
Plasenta ve Apoptozis.....	24
Prematüre Bebeklerde Klinik Durum ve Prognozu Etkileyen Risk Faktörleri.....	25
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	28
BULGULAR .....	31
TARTIŞMA.....	43
SONUÇ VE ÖNERİLER .....	49
KAYNAKLAR.....	51
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	56
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	57
TABLolar DİZİNİ.....	58

## ÖZET

Prematürite ve bununla ilişkili durumlar, yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerini oluşturmaktadır. Preterm bebeklerin klinik durumu ve prognozu plasental hastalıkları da içeren birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu çalışmada preterm bebeklerin klinik durumu ve prognozu ile plasental apoptozis oranı arasındaki olası ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 58 preterm, 31 sağlıklı termbebek olmak üzere toplam 89 yenidoğan bebek alındı. Preterm bebeklerin 13'ünde ayrıca intrauterin gelişme geriliği (İUGG) mevcuttu. İUGG'si olan bebeklerin doğum ağırlıkları gebelik yaşına göre düşük (small for gestational age- SGA) iken, diğer bebeklerin ağırlıkları gebelik yaşına göre normaldi (appropriate for gestational age- AGA). Hasta bebeklerin klinik durumunu değerlendirmek için Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, Version II (SNAPPE-II) kullanıldı ve plasental apoptozis M30, bax ve bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Term infantların plasentaları, sağlıklı term infantlardaki normal plasental apoptozisi göstermek için kullanıldı.

Preterm AGA bebekler ile SGA bebekler arasında, SNAPPE-II ile plasental apoptozis oranları arasında önemli bir pozitif korelasyon bulundu ( $p<0.001$ ). Plasental apoptozisin, preterm AGA bebeklerde 1. ve 5. dakika Apgar skorları ile (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p=0.002$ ) ve preterm SGA bebeklerde 5. dakika Apgar skoru ile negatif korelasyonu vardı ( $p=0.045$ ). Preterm AGA bebeklerde nazal CPAP, mekanik ventilasyon ve hastanede yatış süresinin, plasental apoptozis oranı ile pozitif korelasyonu vardı (sırasıyla  $p=0.038$ ,  $p=0.001$  ve  $p<0.005$ ). Plasental apoptozis oranı, daha sonra sepsis gelişen preterm hastalarda daha yüksekti. Plasental apoptozis ile mortalite, intrakraniyal kanama, pnömotoraks oranları, doğum şekli ve cinsiyet arasında bir ilişki saptanmadı.

Entübe edilme durumuna göre yapılan ROC eğrisi ile SNAPPE-II  $> 28$  olan preterm bebekler yüksek riskli bebek olarak tanımlandı. SNAPPE-II 28'in üstünde olan infantlarda plasental apoptozis, SNAPPE-II 28 ve altında olan bebeklerdekine göre anlamlı bir şekilde daha yüksekti ( $p=0.015$ ).

Sonuç olarak, plasental apoptozis oranı yüksek olan preterm bebeklerin, yenidoğan döneminde klinik durumlarının daha kötü olduğu görüldü. Bu

bebeklerin uzun süreli takibi, artmış plasental apoptozis oranının uzun süreli etkileri hakkında ayrıntılı bilgiler verebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, Plasenta, Prematürite, SNAPPE-II



## **ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF PLACENTAL APOPTOSIS ON CLINICAL CONDITION AND PROGNOSIS OF PRETERM BABIES**

Prematurity and related disorders are the leading causes of mortality and morbidity in neonatal intensive care units. Clinical condition and prognosis of preterm babies are affected by many factors including placental disorders. The aim of this study was to investigate the possible relationship between the rate of placental apoptosis and clinical condition and prognosis of preterm babies.

A total of 89 infants (58 preterm, 31 healthy term) were included in the study. Intrauterine growth retardation (IUGR) was present in 13 preterm infants who were also small for gestational age (SGA) and the remaining babies were appropriate for gestational age (AGA). Clinical condition of a sick baby was evaluated using Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, Version II (SNAPPE-II) and placental apoptosis was evaluated by M30, bax and bcl-2 immunohistochemical staining methods. Placentas of term infants were used to show normal placental apoptosis in healthy term infants.

A significant positive correlation was found between SNAPPE-II and the rate of placental apoptosis among preterm AGA and SGA infants ( $p < 0.001$ ). Placental apoptosis was negatively correlated with 1 and 5 minutes Apgar scores ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.002$  respectively) in preterm AGA and 5-minute Apgar score ( $p = 0.045$ ) in preterm SGA infants. Durations of nasal CPAP, mechanical ventilation and hospitalization were positively correlated with the rate of placental apoptosis ( $p = 0.038$ ,  $p = 0.001$  and  $p < 0.005$  respectively) in preterm AGA infants. The rate of placental apoptosis seemed to be higher in preterm AGA infants who later developed sepsis. Placental apoptosis was not related with the rates of mortality, intracranial hemorrhage, pneumotorax and the mode of delivery and gender of preterm AGA and SGA infants.

Preterm infants with SNAPPE-II  $> 28$  were calculated to be in high risk using ROC curve generated according to intubation. Placental apoptosis was found to be significantly higher in all preterm infants having SNAPPE-II  $> 28$  compared to infants with a score of  $\leq 28$  ( $p = 0.015$ ).

In conclusion, preterm infants with increased rate of placental apoptosis seem to have worse clinical condition during neonatal period. Follow up of these

infants may give detailed information about the long term effects of increased placental apoptosis.

**Key Words:** Apoptosis, Placenta, Prematurity, SNAPPE-II





## GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü 37. gebelik haftası tamamlanmadan canlı doğan tüm bebekleri prematüre olarak tanımlamaktadır. Prematüre bebeklerin morbidite ve mortalite oranlarının zamanında doğan bebeklerinkinden çok daha yüksek olduğu ve neonatal mortalitenin önemli bir kısmının prematüre bebek ölümlerine bağlı olduğu bilinen bir gerçektir<sup>1</sup>. Ülkemizde bebek ölümlerinin yaklaşık yarısının neonatal dönemde ve bunun da yarısının ilk bir haftada ortaya çıktığı düşünülür ise prematüre bebek bakımının ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir<sup>2</sup>. Prematüre bebeklerin mortalite ve morbiditesini etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır. Plasentada meydana gelen tüm değişikliklerin de bebeği etkilediği düşünülmektedir. Gebelik boyunca plasentada meydana gelen en önemli değişikliklerden birisi de apoptozistir<sup>3</sup>.

Yaşamakta olan hücreler nekroz ve apoptozis ile ölürlür. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir<sup>4</sup>.

Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen 'apoptosis' terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wylie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır<sup>5</sup>. Yunancada 'apo'; ayrı, 'ptosis'; düşen anlamındadır. İlk kez 1983 yılında jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak Deoksiribonükleik Asit (DNA) kırıklarına neden olduğu gösterilmiş ve böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir<sup>6</sup>. Bu tarihten itibaren apoptozis ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır.

Plasental apoptozis ise, son yıllardaki çalışmaların ilgi odağı olmuştur. Plasentada apoptozisin fizyolojik rolü üzerinde çalışılmış ve patolojik durumlarda meydana gelen değişiklikler incelenmiştir<sup>3,7</sup>. Plasental apoptozisin villuslar seviyesinde anne ve fetus arasında madde değişimini kolaylaştıran, normal gebelikte görülebilen bir fizyolojik olay olduğu saptanmıştır<sup>7</sup>. Ayrıca plasentadaki apoptotik hücre sayısının gebelik yaşı ile arttığı bildirilmiştir<sup>3</sup>. Plasentada iskemi ve koagülasyon bulunan bölgelerde apoptotik hücrelerin daha fazla bulunması apoptozisin plasentadaki patolojik durumlarda da rol oynayabileceğini

düşündürmektedir<sup>8</sup>. Benzer şekilde intrauterin gelişme geriliği (İUGG) veya preeklampsi sonucunda plasentada apoptozisin artmış olduğu rapor edilmiştir<sup>9,10</sup>.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda plasentadaki apoptotik indeks ile yenidoğanların klinik durumları ve prognozu arasındaki ilişkiye değinilmemiştir. Biz de artmış plasental apoptozisin prematüre bebeklerin klinik durumlarını ve prognozunu kötü yönde etkilediği hipotezini geliştirdik. Bu hipotezin doğruluğunu araştırmak üzere hastanemizde doğan ve yenidoğan yoğun bakım ünitemize yatırılan prematüre bebeklerin mortalite riski ve hastalık şiddeti ile plasentalarındaki apoptoz derecesi arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.



## **GENEL BİLGİLER**

### **Apoptozisin Tanımı**

Ökaryotik organizmalardaki hücreler oluştuktan sonra, belli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin, bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlük, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Fakat, miyokard hücreleri veya nöronlar yıllarca yaşarlar. Kas hücrelerimizin veya nöronlarımızın kabaca %10-15'ini ömrümüzün sonuna doğru kaybetmekteyiz. Nöronların çok sayıda ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde doğumda fazla sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağına sağlanabilmesi için azalır. Bu nöron kayıpları gereklidir ve hücre ölümleri apoptozis ile gerçekleşir. Zamanı gelince bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlük (programlı hücre ölümü). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli "fizyolojik hücre ölümü" olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (hücre intiharı) ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. İşte, tüm bu kavramlar (programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü ve hücre intiharı) apoptozis ile eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir.

Apoptoz rejenerasyon ve tamir olaylarında, homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Apoptozun artması nörodejeneratif hastalıklara, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome; Edinsel İmmün Yetersizlik Sendromu)'de görülen lenfosit yetersizliğine; azalması ise malignite ve otoimmün hastalıklara yol açabilir<sup>11</sup>.

### **İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar**

Apoptotik yol çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olaylarda kullanılır. Bunlar Tablo 1'de özetlenmiştir<sup>12</sup>.

### **Embriyonal ve Fetal Gelişimde Apoptoz.**

Embriyogenez ve fetogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacı ile, oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apoptozis ile ölmektedir. Özellikle sinir sisteminin ve immün sistemin gelişiminde apoptoz önemli bir rol oynamaktadır. Sinir sistemi gelişirken çok sayıda nöron ve sinaps oluşur. Apoptoz ile nöronal havuz hedef olan miktara indirilmekte, aksonları hedeflerine ulaşamayan nöronlar ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasında

oluşan bağlantı hataları onarılmaktadır. İmmün sistemde ise, oluşan fazla ve otoreaktif hücreler ortadan kaldırılarak, bunların emriyo ve fetuse zarar vermesi engellenmektedir<sup>12,13</sup>.

### **Tablo 1. İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar.**

---

Embriyonal ve fetal gelişimde
Hormon azalmasına bağlı atrofilerde
Dokulardaki homeostazının sağlanmasında
İmmün reaksiyonlarda, savunma mekanizması olarak
Hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda
Yaşlılıkta

---

İntrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalı iken parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoza uğraması sonucunda parmaklar birbirinden ayrılmaktadır<sup>14</sup>. Embriyonun gelişmekte olan epidermisin en üst sırasındaki bazı hücreler (periderm) de apoptoza giderek amnion sıvısına atılırlar. Apoptoz embriyonal gelişmenin erken döneminde izlenmekte, ayrıca böbrek taslaklarının dejenerasyonunda da önemli rol üstlenmektedir<sup>15,16</sup>.

#### **Hormon azalmasına bağlı atrofilerde apoptoz**

Erişkinlerde hormon yetersizliğine bağlı olarak gelişen organ gerilemelerinde apoptoz rol almaktadır. Örneğin; menstrasyonda endometrial hücre yıkımı, menapozda ovaryum follüküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesi, orşiektomi sonrasında prostat atrofisi gelişmesi<sup>6,12,17</sup>.

#### **Dokulardaki homeostazının sağlanmasında apoptoz**

Proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında (barsak kript epiteli) apoptoz sık oluşur.

#### **İmmün reaksiyonlarda, savunma mekanizması olarak apoptoz**

Tümörlerde özellikle gerileme dönemlerinde apoptoz sık görülür. T ve B lenfositler sitokin yetersizliğine bağlı olarak apoptoza gidebilirler. Hücrel immün red ve graft versus host reaksiyonlarında sitotoksik T lenfositler aracılığı ile apoptoz oluşur.

## Hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda apoptoz

Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal tıkanmasına bağlı olarak gelişen atrofilerde apoptoz izlenir. Çeşitli viral hastalıklarda da (örneğin viral hepatit) apoptoz görülür. Hücrelerde hasar oluşturan çeşitli etmenler (ısı, radyasyon, kanser ilaçları, hipoksi gibi) çoğunlukla nekroza neden olurken bir miktar da apoptozis oluşturabilmektedirler<sup>12,17</sup>.

Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması bir çok önemli hastalığın patogeneğinde rol oynar. (Tablo 2). Günümüz araştırmacıları yeni bir kavram olan apoptozisi yaşamın sürdürülmesinde temel mekanizma olarak görmektedir. Bu yüzden etyolojisini tam olarak açıklayamadığımız pek çok hastalığın aydınlatılmasında ve belki de tedavisinde ileride apoptozis anahtar rol oynayabilecektir.

**Tablo 2. Apoptozisin İnhibisyonu ve Artışı İle Seyreden Hastalıklar.**

<b><i>Apoptozisin İnhibisyonu İle Seyreden Hastalıklar</i></b>	<b><i>Apoptozisin Artması İle Seyreden Hastalıklar</i></b>
<b>Kanser</b>	<b>AIDS</b>
Foliküler Lenfomalar	<b>Nörodejeneratif Bozukluklar</b>
p53 mutasyonu olan karsinomalar	Alzheimer Hastalığı
Hormon bağımlı tümörler	Parkinson Hastalığı
Meme kanseri	Amiyotrofik lateral sklerozis
Prostat kanseri	Retinitis pigmentosa
Over kanseri	Serebellar dejenerasyon
<b>Otoimmün Bozukluklar</b>	<b>Miyelodisplastik Sendromlar ve Aplastik Anemi</b>
Sistemik Lupus Eritematozus	<b>İskemik Hasar</b>
İmmün Aracılıklı Glomerülonefrit	Miyokard İnfarktüsü
<b>Viral Enfeksiyonlar</b>	İnme
	<b>Toksik Karaciğer Hasarı</b>
	Alkolik siroz

## Apoptozis ve Nekrozis

Apoptozisi anlamak için nekrozisten farkının bilinmesi gerekmektedir. Bunun için Tablo 3'de nekrozis ile apoptozisin farkları özetlenmiştir.

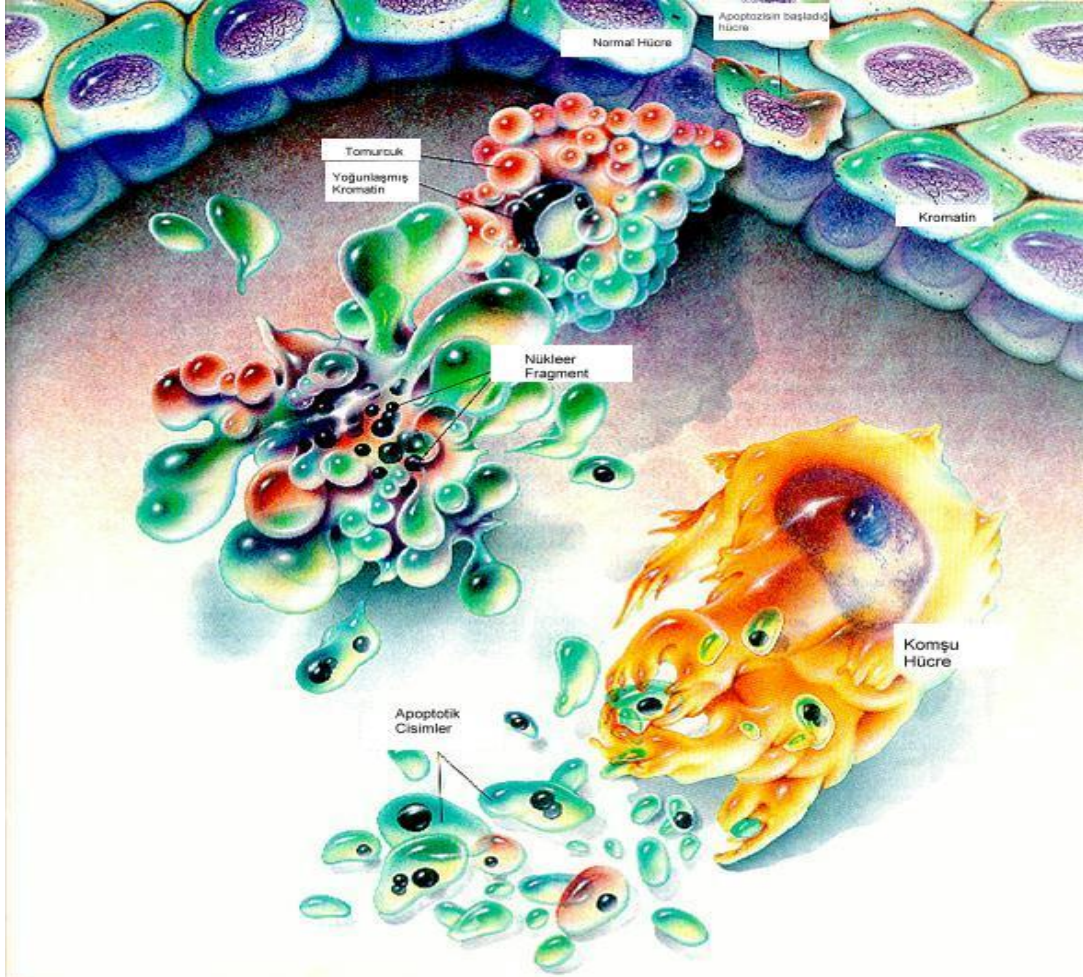
**Tablo 3. Nekrozis ve Apoptozisin Karşılaştırılması.**

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
<b>Yol açan nedenler</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-İskemi</li><li>-Hipertermi</li><li>-Hipoksi</li><li>-Viral enfeksiyonlar</li><li>-Toksik maddeler</li><li>-Şiddetli oksidatif stres</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Büyüme faktörü eksikliği</li><li>-Hücre yaşlanması</li><li>-HIV virüsü</li><li>-Kanser ilaçları</li><li>-Radyasyon</li><li>-Yüksek doz glukokortikoid verilmesi</li><li>-Fas veya TNFR-1 reseptörleri aktivasyonu</li><li>-Sitotoksik T lenfositler</li><li>-Çok şiddetli olmayan oksidatif stress</li></ul>
<b>Morfolojik özellikler</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücre zarı bütünlüğü kaybolur</li><li>-Hücre şişer</li><li>-Endoplazmik retikulum dilate olur.</li><li>-Büyük vakuoller oluşur</li><li>-Hücre parçalanır</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Bütünlüğü bozulmamış hücre zarında kabarcıklar oluşur.</li><li>-Kromatinin hücre zarı civarında toplanır ve yoğunlaşır</li><li>-Hücre küçülür</li><li>-Nükleus apoptotik cisimcikler halinde küçük parçalara ayrılır.</li></ul>
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-İyon dengesi bozulur</li><li>-ATP gerekmez (pasif süreç)</li><li>- +4 °C'de gerçekleşebilir</li><li>-DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-İyi kontrollü, bazı aktivasyonlar ve enzimatik basamaklar vardır</li><li>-ATP gereklidir (aktif süreç)</li><li>- +4 °C'de gerçekleşmez</li><li>-DNA internukleozomal alanlarda 180 kb katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni apoptozisin en önemli belirtici)</li></ul>
<b>Diğer özellikler</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücreler gruplar halinde ölür</li><li>-Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir</li><li>-Lizozomal enzimler salınır</li><li>-İnflamasyona neden olur</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür</li><li>-Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir</li><li>-Apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler</li><li>-İnflamasyon görülmez</li></ul>

TNFR-1: Tümör Nekroz Faktör Reseptör -1.

Tabloda görüldüğü gibi, nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıkta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır.

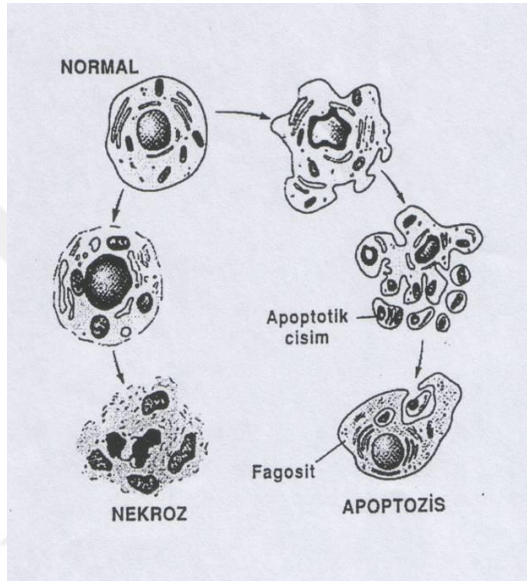
Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekroziste kromatin yapısı hemen hemen normal hücredekine benzerdir, ancak apoptotik hücrenin kromatini çekirdek zarının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Nekrotik hücrenin zarı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içi materyallerinin dışarı çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücrenin zarı bütünlüğünü korumaktadır ancak üzerinde küçük kabarcıklar oluşur daha sonra apoptotik cisimciklere parçalanır<sup>18</sup>(Şekil 1).



Şekil 1. Apoptotik hücre zarı üzerindeki küçük kabarcıklar



Apoptotik cisimcikler membran ile kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler (Şekil 2). Nekrozisde hücre içeriğinin dış ortama saliverilmesi sonucu inflamatuvar hücreler uyarılır. Oysa apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz<sup>14</sup>.



**Şekil 2. Apoptozis ve nekrozun morfolojik görünüşleri.**

Apoptozisin en önemli ve özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. Bu görüntü apoptozis tanısında kullanılmaktadır. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca Deoksiribonükleaz I ve II de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidil gliserinin erken evrede membranın dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.



## **Apoptozisin Biyokimyasal Özellikleri**

Apoptotik hücrelerin biyokimyasal özellikleri nekrotik hücrelerde görülenlere benzemekle birlikte, bazı özellikleri çok daha spesifiktir.

**Protein Ayrılması:** Protein hidrolizi apoptozisin spesifik bir özelliğidir.

Bu olay Caspase (**cysteine-containing aspartate specific protease**) olarak adlandırılan, pek çok üyesi bulunan yeni keşfedilmiş sistein proteazlar ailesinin aktivasyonu ile gerçekleşir. Caspase'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Caspase'lar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir reaksiyon zincirine neden olurlar. Bazıları (Caspase 2, 8, 9, 10) başlatıcı Caspase'lar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör Caspase'lar olarak bilinir. Başlatıcı Caspase'lar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör Caspase'lara naklederler. Efektör Caspase'lar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar<sup>14</sup>.

**Protein Çapraz Bağlanması (Cross-Linking):** Transglutaminaz aktivasyonu ile protein çapraz bağlanması sitoplazmik proteinleri apoptotik cisimciklere dönüştürür<sup>14</sup>.

**DNA Yıkımı:** Apoptotik hücrelerde karakteristik olarak DNA yıkılarak 50-300 kilobaz'lık büyük parçalara ayrılır. Daha sonra DNA'nın oligonükleozomlara ayrıldığı internükleozomal ayrılma ortaya çıkar. Bu olay  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ 'a bağımlı endonükleazlar ile 180-200 baz çiftinin oluşması şeklindedir. Parçacıklar, agar jel elektroforezi ile DNA merdivenleri şeklinde gösterebilir<sup>14</sup>.

**Fagositik Tanıma:** Apoptotik hücreler, hücre zarının dış kısmında fosfatidilserini açığa çıkarırlar. Apoptozisin bazı tiplerinde apoptotik cisimcikler yüzeyde trombospontin denilen yapışkan bir glikoproteini açığa çıkarırlar. Bu değişiklikler ölü hücrelerin, proinflamatuvar hücreler salınmaksızın makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınmasını sağlar. Böylece makrofajlar apoptotik hücreleri çevre dokuya hasar vermeyecek ve enflamasyona neden olmayacak şekilde elimine eder<sup>14</sup>.



1:Çeşitli stimuluslarla apoptozisin başlatılması, 2: Bcl-2 ailesi tarafından oluşturulan kontrol ve düzenlenme safhası, 3: Hücre iskeleti ve nükleer proteinleri parçalayan endonükleaz ve proteazların ölüm Caspase'ları tarafından aktivasyonu, 4: Apoptotik cisimlerin ve fagositozun olduğu en son safha.

### **Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu:**

Bazı sitokinler hücre zarında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozda rol alan hücre zarı reseptörleri içinde en önemli grup Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR) ailesidir<sup>12</sup>. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1 (TNFR1)'dir<sup>12,19</sup>.

**TNF ile indüklenen Apoptozis:** Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörü olarak bilinen Fas ve TNFR 1'in ilgili ligandı ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörü membranda bulunur ve TNFR ailesinin bir üyesidirler. Fasın ilgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandları ile bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri olaylar zinciri gerçekleşir. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain- Tümör Nekrozis Reseptör 1 ölüm bölgesi olan adaptör protein) ve FADD (Fas Associated Death Domain; Fas ölüm bölgesi bulunan adaptör protein) ile reaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise procaspase 8'i aktifleştirerek caspase'lerin kaskad tarzında aktivasyonunu başlatır. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır.

Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in TRADD ile etkileşmesi her zaman apoptoz ile sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kB (NF-kB) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun nasıl seçileceği açık değildir. Ancak hücrede aktif NF-kB bulunduğu zaman, hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir<sup>12</sup>.

**FAS-FASL ilişkili Apoptozis:** Bu tip apoptoz hücre yüzey reseptörü Fas (CD95 veya Apo-1 olarak da bilinir) aracılığı ile oluşur. Fas, 335 aminoasitli, sisteinden zengin bir transmembran glikoproteinidir ve NGF (Nerve Growth Faktor, Sinir büyüme faktörü) / TNF reseptör ailesine mensuptur ve hücreyi

apoptotik hücre ölümüne götüren sinyalleri iletebilir<sup>20,21,22,23</sup>. İnsanda Fas geni 10. kromozomun uzun koluna lokalizedir. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, fas adaptör proteinle birleşerek DISC'i (Death Inducing Signal Complex; ölüm başlatan sinyal kompleksi) oluşturur. Bu da procaspase 8'in aktifleşmesini sağlar.

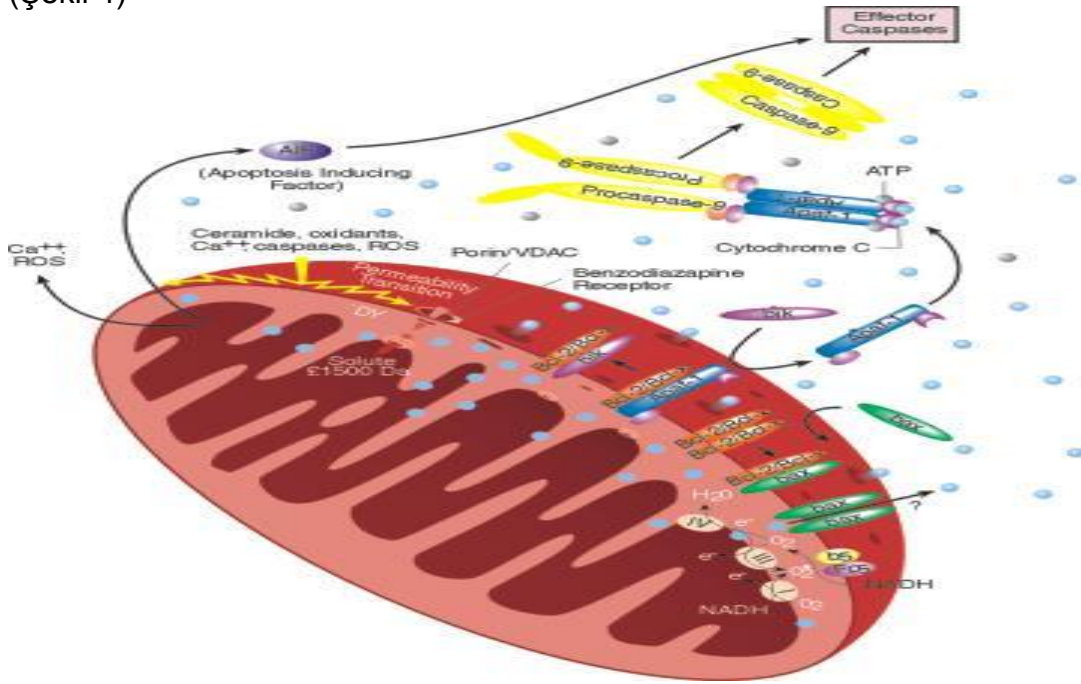
Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl Fas ligand immün sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanması ile, immün reaksiyon ile aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apoptoz ile yok edilmelerini sağlamış olur<sup>12</sup>.

### Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller:

DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

### 2) Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. İç sinyaller ile oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktasının mitokondri olduğu görülmüştür. (Şekil 4)



Şekil 4. Apoptozisde mitokondrinin rolü.

Mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi) ve caspase 9'un aktivasyonu apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 (B-cell lymphoma / leukemia-2) protein ailesidir. Bcl-2 dış mitokondrial membran, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında bulunur<sup>24,25,26</sup>. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri (Tablo 4) olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu). Bcl-2 proteini anti-apoptotiktir. Mitokondri dış membranına ve Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör- 1 (APAF-1)'e tutunmuştur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller APAF-1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c sitoplazmada APAF-1, caspase 9 ve Adenozin trifosfat (ATP) ile birleşir. Oluşan yapıya apoptozom denir. Apoptozom sonlandırıcı Caspase olan Caspase 3'ü aktive ederek apoptoza neden olur<sup>27,28</sup>.

**Tablo 4. Bcl-2 ailesi.**

Ölümü Baskılayanlar	Ölümü Başlatanlar
Bcl-2	Bax
Bcl-XL	Bcl-Xs
E1B-19K	Bak
CED-9	Bad

### 3) Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler

**Biyokimyasal Değişiklikler:** Sonlandırıcı Caspase'lar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

Caspase'ların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin flamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder<sup>29</sup>.

**Morfolojik Değişiklikler:** Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirine yakınlaştığı izlenir.

#### 4) Fagositoz

Apoptotik hücreler fagositler ve komşu hücreler tarafından ortadan kaldırılırlar.

#### Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. Aktif Caspase-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesi ile de saptanabilmektedir.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri (ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu, faz kontrast mikroskobu)
2. İmmünohistokimyasal yöntemler (Anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, M30 yöntemi, Caspase-3 yöntemi)
3. Biyokimyasal yöntemler (Agaroz jel elektroforezi, Western Blotting, Flow sitometri)
4. İmmunolojik yöntemler (ELISA, Fluorimetrik yöntem)
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

**M30 Yöntemi:** Apoptotik hücreler, cytokeratin 18 (CK 18)'in caspase'ların etkisi ile kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece cytokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır. Epitelyal hücrelerde bulunan bir ara filamentin komponentidir. Apoptozise uğrayan epitelyal hücrelerde caspase'lar bir CK 18 epitopunu ortaya çıkarırlar<sup>30,31,32,33</sup>. Monoklonal antikor (MoAb) M30 bu epitopu tanımlar<sup>34,35,36,37</sup>. Daha önceki yayınlarda MoAb M30'un canlı epitelyal hücreler veya nekrotik hücreler ile reaksiyona girmediği ileri sürülmüştür<sup>30,36</sup>

CK 18 neo epitopunun tanımlanması apoptozis için spesifik gibi görülmektedir. M30 immün reaksiyonun kullanımı çok kolaydır. Kolaylıkla tekrar edilebilir ve endonükleaz aktivasyonundan bağımsızdır. M30, Cytokeratin18'in caspase aracılıklı fragmentini tanır ve bundan dolayı sadece caspase aracılıklı apoptoziste bulunma olasılığı bulunur.

Apoptozisin değerlendirilmesinde son zamanlarda sıklıkla TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) yöntemi kullanılmaktadır. TUNEL boyama tekniği ilk defa 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır<sup>38</sup>. TUNEL testi apoptozis kaskadının son evresine ulaşan ve yakında ölecek olan hücreleri tespit etmek için geliştirilmiştir<sup>30</sup>. TUNEL tekniği yaygın olarak kullanılmakla birlikte bu testin uygulanabilirliği bazı nedenlerden dolayı güçtür. Bunlar arasında:

1- Bir çok araştırmacının gittikçe artan sayıda yanlış pozitif TUNEL reaksiyonu bildirmeleri<sup>8,39,40,41</sup>.

2- Nekrotik hücrelerin de TUNEL ile boyanabilmesi<sup>42</sup>

3- Endonükleaz aktivasyonu sadece kaskadın çok geç evrelerinde aktive olduğu için, apoptozis kaskadındaki hücrelerin çok az bir kısmının TUNEL ile boyanabilmesi<sup>43,44</sup>.

4- Endonükleaz aktivasyonunun ve dolayısı ile TUNEL pozitifliğinin apoptozis sırasında bypass edilebilmesi<sup>45</sup>.

5- Plasenta gibi kompleks dokularda TUNEL testinin apoptotik trofoblastları diğer apoptotik hücre tiplerinden ayıd edememesi sayılabilir.

**Bax ve Bcl-2:** Antiapoptotik Bcl-2 proteini ve proapoptotik bax proteini apoptozisde anahtar rol oynar<sup>46</sup>. Bax, bcl-2'nin ölüm başlatıcı heterodimer bir partneridir. Bax normal matürasyonları boyunca ölen pek çok hücre tipinde yaygın olarak eksprese edilir. Bax ve Bcl-2 homolog proteinler olup apoptotik yolları büyük ölçüde mitokondrial fonksiyonları regüle ederek düzenlerler. Bcl-2 apoptozisi inhibe ederken Bax uyarır. Bu iki protein arasındaki denge hücrelerin ölümünü belirler. Bax'ın Bcl-2'ye bağlanması bozulduğu zaman Bcl-2'nin koruyucu fonksiyonu ortadan kalkar. O nedenle Bcl-2 etkisini gösterebilmek için Bax'a bağlanmak zorundadır. Bcl-2 dış mitokondrial membran, endoplazmik retikülüm ve nükleer zafta yer alır<sup>14</sup>.

Gebeliğin tüm dönemi boyunca plasentada bcl-2 protein ekspresyonunun immünohistokimyasal incelemesi bu proteinin villöz ve ektravillöz sinsityotrofoblastların sitoplazmasında lokalize olduğunu gösterilmiştir<sup>47</sup>. Proapoptotik Bax markerinin trofoblastik hücrelerin her iki tipinde tüm gebelik periyodu boyunca yaygın ekspresyonu bulunmaktadır. Proapoptotik Bax markeri hem sito hemde sinsityotrofoblastlarda görülmüştür<sup>47</sup>.

## **PLASENTA VE APOPTOZİS**

### **Plasenta:**

Anne ile fetüs arasında ilginç ve anlaşılması zor bir ilişki vardır. Annenin immün sistemi için tamamen yabancı olan fetal dokuların büyük bir ahenk içinde büyümesi ve bazı durumlar dışında hiçbir reaksiyona neden olmaması araştırmacıların dikkatini çekmiş ve yıllar boyunca inceleme konusu olmuştur. İnsanın karakutusu olarak nitelendirilen plasenta, fetüsün yaşaması, büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan maddelerin (besin, oksijen) anneden-fetüse geçişini, fetal metabolizma sonucu oluşan atık maddelerin ise fetüsten anneye geçişini sağlayan hayati bir organdır. Olgun plasenta 15-25 mm kalınlıkta, 18-20 cm çapında, 500-600 gr ağırlıkta disk şeklindedir. Kenarlara doğru inceler. Dördüncü ayda maksimum kalınlığa ulaşır. Plasentanın anne ve fetusa bakan iki yüzü vardır. Anneye bakan yüzde birbirlerinden ayrı büyük loblar (kotiledonlar) dikkati çeker. Fetusa bakan yüzü düz, saydam ve parlak amnion zarı ile örtülüdür.

Plasentanın başlıca fonksiyonları arasında:

1. Fetüs-anne arasındaki baraj görevi
2. Anneden fetüse enerji ve besin maddelerinin kesintisiz aktarımı
3. Fetüsün metabolizma artıklarının anne dolaşımına aktarması
4. Fetüsün immünolojik açıdan korunması için fetüse antikör transferi
5. Termoregülasyon
6. Endokrin organ olarak proteo-hormonlar (koryonik gonadotropin, plasental laktojen) steroid hormonlar (östrojen, progesteron) üretimi bulunur.

İnsan plasentası hemokoryoendotelyal tiptedir. Bunun anlamı şudur: Sinsityotrofoblastlar anne kanı ile direk ilişkidir, fakat kan plasentanın intervillöz bölgesinde fetal kapillerler içinde yer alır. Fetal kan fetal kapiller duvarı intravillöz mesafedeki mezenkim ve sitotrofoblastlar tarafından sinsityotrofoblastlardan ayrılmıştır. Normal şartlar altında fetal ve maternal kan direkt ilişki içersine giremez.

Plasenta elemanları arasında trofoblastlar, yapısal, fonksiyonel ve gelişimsel olarak en fazla değişiklik gösteren elemanlardır. İnvaziv olmaları blastokistin uterusu yapışmasını sağlarken, aynı zamanda gebelik ürününün beslenmesinde rol alır ve endokrin fonksiyonu annenin gebeliğe fizyolojik adaptasyonunu sağlar.



Fizyolojik bir gebelik sırasında uterusu yönelik kan akımı 50 ml/dakida 'dan gebelik sonunda 500 ml/dakika'ya ulaşır. Terme yakın uterusu gelen oksijenin yaklaşık yarısı ve glikozun üçte ikisi uteroplasental dokular tarafından tüketilir. Bu dokularda oksijen ve glikoz tüketimi beyin dokusundaki miktarlarla benzerlik göstermektedir.

### **Plasenta ve Apoptozis**

Plasental dokuda apoptozis ilk olarak Yasuda ve arkadaşları tarafından 1995 yılında ele alınmıştır<sup>8</sup>.

İlk ve son trimester normal gebeliklerden alınan plasenta örneklerinde tüm hücre tiplerinde apoptozis gösterilmiş ve apoptotik hücrelerin büyük bir kısmının trofoblastlara ait olduğu ortaya konulmuştur. Yine ilk trimester plasenta örnekleri ile kıyaslandığında son trimester örneklerinde apoptozis insidansının anlamlı oranda arttığı fark edilmektedir. Gebelik ilerledikçe gözlenen artmış apoptozisin doku yaşlanmasının doğal bir sonucu olduğu ve yaşlanan dokularının apoptotik uyarılara daha hassas oldukları şeklinde bir görüş belirtilmiştir<sup>48</sup>.

Plasental yaşlanma ile artan apoptozisin plasentada yeniden şekillenme (remodeling) için bir mekanizma olduğu ve bu sayede sinsityotrofoblast/sitotrofoblast oranının korunarak plasentadan transportun daha da kolaylaştığı vurgulanmıştır<sup>48</sup>.

Çeşitli çalışmalarda ektopik ve normal gebelik arasında plasenta yerleşim yeri ve plasentada apoptotik hücre oranları araştırılarak, apoptozisin plasentanın yerleşim yeri ile ilişkili olabileceği iddia edilmiştir<sup>49</sup>. Normal gebelik ve abortus materyelleri karşılaştırıldığında, spontan abortusta apoptotik hücrelerin artmış oranda tespit edildiği görülmüştür<sup>50</sup>.

Preeklampsi ve İUGG ile komplike olmuş gebeliklerde normal gebeliklere kıyasla plasentada anlamlı oranda artmış apoptozis varlığı dikkati çekmektedir<sup>51,52</sup>. Her iki durumda da artmış plasental apoptozisin neden mi, sonuç mu olduğu tam olarak anlaşılamamıştır.

### **Prematüre Bebeklerin Klinik Durum ve Prognozunu Etkileyen Risk Faktörleri**

Doğum ağırlığına bakılmaksızın 37. hafta tamamlanmadan önce doğan tüm bebekler prematüre olarak tanımlanır. Neonatal bakım ünitelerinin gelişmesi ile preterm infantın sağkalım oranları yükselmiştir. Prematüre bebeklerin

morbidite ve mortalite oranlarının zamanında doğan bebeklerinkinden çok daha yüksek olduğu ve neonatal mortalitenin önemli bir kısmının prematüre bebek ölümlerine bağlı olduğu bilinen bir gerçektir<sup>53</sup>.

Prematüre bebeklerin mortalite ve morbititesini etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır. Bebeğe ait faktörlerin (konjenital malformasyonlar, doğum travması, düşük doğum ağırlığı, fetal enfeksiyon, intra uterin gelişme geriliği vb.) yanı sıra anneye ait faktörler (beslenme yetersizliği, enfeksiyon, kronik hastalıklar, doğum öncesi ve sonrası bakım eksikliği vb.) de oldukça etkilidir.

Intrauterin gelişme geriliği (İUGG), fetal büyüme hızında patolojik bir azalma olması ve bebeğin kendi genetik büyüme potansiyeline sahip olmaması şeklinde tanımlanabilir. SGA (small for gestational age; gebelik haftasına göre küçük) ile sık olarak birbirlerinin yerine kullanıldıkları halde eş anlamlı değildir. İUGG intrauterin dönemde fetusun büyümesinin giderek yavaşlamasıdır. Bebeğin SGA olup olmadığına ise doğumdan sonra karar verilir. Etyolojide fetal (kromozom anomalileri, metabolik hastalıklar, enfeksiyonlar, malformasyonlar), maternal (nütrisyonel, vasküler, renal, hematolojik, çevresel nedenler) ve plasental (infaktlar, çoğul gebelik, plasenta previa, abrupsiyo plasenta, koryoanjioma, artmış plasental apoptozis) nedenler rol oynamaktadır.

İUGG ile birlikte olan doğum asfiksisi, mekonyum aspirasyonu, pulmoner hemoraji, hiperviskozite sendromu ve hipoglisemi gibi komplikasyonlar yenidoğan mortalitesini önemli oranda arttırmaktadır.

Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde risk göstergesi olarak kullanılan doğum ağırlığı, gebelik yaşı, cinsiyet gibi faktörler hastalık ağırlığının saptanmasında yeterli değildir. Bu nedenle çeşitli skollama sistemleri geliştirmiştir. Kullanım kolaylığı açısından skollama sistemlerinin az sayıda parametre içermesi, basit olması ve aynı zamanda da dinamik olup iyi sonuçlar vermesi gerekmektedir. Kullanılan skollama sistemleri, hastanın klinik durumunu belirlemede ve buna uygun yaklaşım için yol gösterici olmanın yanında üniteler arasında da ortak dil oluşturulması için önemlidir.

**Tablo 5. SNAPPE-II parametreleri.**

Parametreler	Puan
Ortalama Kan Basıncı	
20-29 mmHg	9
<20 mmHg	19
Vücut sıcaklığı	
35-35,6 °C	8
<35 °C	15
PO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> oranı	
1,0-2,49	5
0,3-0,99	28
Serum pH	
7,10-7,19	7
<7,10	16
İdrar çıkışı	
0,1-0,9 ml/kg/saat	5
<0,1 ml/kg/saat	18
Konvülsiyon varlığı	19
Doğum Ağırlığı (g)	
< 750	17
750-999	10
SGA (< 3. persentil) varlığı	12
5. dakika Apgar skoru < 7 ise	18

SNAPPE-II:Score for Neonatal Acute Physiology, perinatal Extension, Versiyon II

SGA:Small for gestational age (gebelik yaşına göre küçük)

SNAPPE-II (Score for Neonatal Acute Physiology, perinatal Extension, Versiyon II) yenidoğan yoğun bakım üniteleri için geliştirilmiş, her ağırlıktaki bebeklere uygulanabilir, hastalık şiddeti ve mortaliteyi belirlemede kullanılan bir skorum sistemidir<sup>54</sup>.

SNAPPE-II'de 6 fizyolojik parametre (ortalama kan basıncı, vücut sıcaklığı, PO<sub>2</sub> /FiO<sub>2</sub> oranı, serum pH değeri, konvülsiyon varlığı, idrar çıkış miktarı) ve bu parametrelere ek olarak doğum ağırlığı, düşük apgar skoru ve SGA varlığı kullanılmaktadır<sup>54</sup>(Tablo 5).

Bu skorum sistemi klinisyen ve araştırmacılara mortalite riskini temel fizyolojik parametrelere dayanarak tahmin etme yolu sunmaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

**Çalışma Grubu.** 1 Eylül 2003 – 30 Eylül 2004 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde doğan ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'ne yatırılan 58 prematüre ve miadında doğan 31 sağlıklı olmak üzere toplam 89 bebek çalışmaya alındı.

37. gebelik haftasını tamamlamadan canlı doğan bebekler prematüre olarak kabul edildi. Gebelik yaşı tayini için son adet tarihi ve/veya birinci trimester ultrasonografi bulguları kullanıldı. Fetal yaş 12. haftaya kadar tepe - topuk mesafesine göre, 12-20. haftalar arasında ise biparietal çapa göre hesaplandı.

Takibe gelen gebelerin bebeklerinin intrauterin dönemde gebelik yaşına göre uygun gelişip gelişmedikleri fetal abdominal çevre, baş çevresi, biparietal çap ve femur uzunluğu ölçüleri ile değerlendirildi. Gebelik yaşına göre belirlenen ortalama değerlerin 2 standart sapma altında olanlar İUGG olarak kabul edildi. Bebekler doğduktan sonra yapılan ağırlık ölçümleri ortalama değerlerin 2 standart sapma altında olanlar gebelik yaşına göre küçük (small for gestational age- SGA) olarak kabul edildi. Gebelik yaşına göre normal büyüyen (appropriate for gestational age – AGA) prematüre bebeklerle SGA prematüre bebekler iki ayrı grupta toplanarak incelendi.

Aşağıdaki özelliklere sahip bebekler çalışmaya alınmadılar:

1. Çoğul gebelik ürünü olanlar
2. Hastanemiz dışında doğanlar
3. Taburcu edildikten 48 saat sonra tekrar yoğun bakım ünitemize yatırılanlar
4. Doğum odasında ölenler
5. Majör konjenital anomalileri olanlar
6. Plasentalarında enfeksiyon bulgusu olanlar

Tamamen normal seyreden bir gebeliğin ardından miyadında sağlıklı bebeklerin plasentaları gebelikte ortaya çıkan fizyolojik apoptozis hakkında fikir vermesi açısından incelendi.

Tüm bebeklerin ilk 12 saat içinde SNAPPE-II puanları Tablo 5'te belirtildiği şekilde hesaplandı.

**Plasentaların Alınması.** Plasentalar doğum sonrasında hemen %10'luk formalin içerisine kondu ve patoloji laboratuvarına gönderildi.

**Histopatolojik değerlendirme.** Plasentaların boyutları ölçüldükten sonra membranlar ve umbilikal kord kesilerek uzaklaştırıldı ve hassas terazi ile ağırlıkları belirlendi. Bir santimetre kalınlığında seri olarak dilimlenen plasentalarda saptanan makroskopik patolojik değişiklikler not edildi. Tüm plasentalardan perifer ve merkezini temsil edecek şekilde ortalama 4 ile 6 arasında örnek alınarak rutin takip işlemleri yapıldı. Alınan tüm örnekler klinik tanılar ve takip bilgileri bilinmeksizin, ışık mikroskopu ile (Olympus BX50) aynı patolog tarafından değerlendirildi.

Uygun parafin bloklar immünohistokimyasal inceleme için seçildi. Bloklardan hazırlanan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere Avidin Biotin kompleks immün peroksidaz yöntemi ile monoklonal mouse antikoru, Bcl-2<sup>55</sup> (1:100 dilüsyon, Neomarkers, RB-090-P010), monoklonal mouse antikoru, Bax<sup>55</sup> (1:100 dilüsyon, Neomarkers, RB-090-P010) ve monoklonal mouse antikoru, M30 (1:50 dilüsyon, Neomarkers, RB-090-P010) uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde Lab-Vision, Ultravision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (ready to use) biyokimyasal kit kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopu ile incelendi ve sitoplazmik koyu kahve renkteki boyanmalar pozitif olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme için önce 4X , ardından 10X objektif büyütme altında en uygun alanlar seçildi. Ardından 40X objektif büyütme altında seçilen 5 alanda ortalama 500 trofoblastik hücre sayılarak bu hücrelerdeki pozitif boyanma, yüzde cinsinden hesaplandı.

Plasental apoptozis oranı ile SNAPPE-II puanları, 1. ve 5. dakika Apgar skorları, ölüm oranı, intrakranial kanama, pnömotoraks, sepsis ve entübasyon riski, mekanik ventilatöre bağlı kalma, CPAP uygulama (Continuous Positive Airway Pressure; hava yoluna devamlı pozitif basınç uygulaması), yatış süreleri ve cinsiyet arasındaki ilişki değerlendirildi. Entübasyon kriterine göre Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrisi kullanılarak SNAPPE-II eşik değeri bakıldı ve bu eşik değerinin altında (düşük risk grubu), ve üstünde (yüksek risk grubu) olan bebeklerin apoptotik indeksleri karşılaştırıldı.

**İstatistiksel Yöntemler.** Bütün hastaların verileri “SPSS for Windows release 12.0” programına girildi.

Apoptotik göstergeler (M30, bax, bcl-2) ile sürekli klinik değişkenler (SNAPPE-II, yatış süresi, doğum ağırlığı, apgar skorları, mekanik ventilasyon entübasyon ve CPAP süreleri, plasenta ağırlığı, gebelik haftası) arasındaki

ilişkiler preterm-AGA ve SGA bebek gruplarında ayrı ayrı olacak şekilde Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

Preterm-AGA ve SGA gruplarında apoptotik göstergelerin (M30, Bax, Bcl-2) pnömotoraks, sepsis, intrakranial kanama gelişen entübe edilen ve ölen bebeklerde farklı olup olmadıkları Anova testi ile incelendi. Yine bu bebeklerin yatış, entübasyon ve CPAP süreleri arasında fark olup olmadığı ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi.

SNAPPE-II değeri ile sürekli klinik değişkenler (yatış süresi, doğum ağırlığı, apgar skoru, entübasyon ve CPAP süresi, plasenta ağırlığı, gebelik haftası) arasındaki ilişki preterm-AGA ve SGA gruplarında ayrı ayrı olacak şekilde Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

ROC eğrisi kullanılarak elde edilen SNAPPE-II eşik değerinin altında (düşük risk grubu) ve üstünde (yüksek risk grubu) olan bebeklerin ortalama doğum ağırlığı, gebelik yaşı ve plasental apoptozis yüzdesi arasındaki farklar bağımsız Student-t, yatış süresi, CPAP ve mekanik ventilasyon süreleri arasındaki farklar ise Mann-Withney U test ile analiz edildi. Düşük ve yüksek risk grubundaki hastalarda sepsis, mortalite, intrakranial kanama, pnömotoraks, entübe edilme oranları arasındaki ilişki Chi-Square testi ile incelendi.

**Etik Komite Onayı.** Çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

## BULGULAR

Gruplara göre klinik değişkenler (cinsiyet, doğum şekli, entübasyon, pnömotoraks, sepsis, intrakranial kanama, mortalite) tablo 6 ve şekil 5'de özetlenmiştir. Bebeklerin 45'i preterm AGA (21 kız, %46.7; 24 erkek, %53.3), 13'ü preterm SGA (3 kız, %23.1; 10 erkek, %76.9) idi. Preterm SGA grubunda erkeklerin oranı anlamlı şekilde yüksekti ( $p=0,006$ ). Sağlıklı term bebek grubunda ise 31 hastanın 12'si kız (% 37.5), 20'si erkek (% 62.5) idi.

Preterm AGA hastaların 8'i (%17.8) spontan vajinal yol ile, 37'si (%82.2) sezaryen ile doğmuşlardı. Preterm SGA hasta grubunda ise sadece 2 hasta (%15.4) spontan vajinal yol ile doğmuştu. Her iki grupta da sezaryen ile doğum anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,05$ )

Entübasyon işlemi preterm AGA hastaların %26.7'sine, preterm SGA hastaların %30.8'ine uygulanmıştı. Pnömotoraks ve intrakranial kanama sadece preterm AGA hasta grubunda gözlemlendi (sırası ile %4.4, %8.9) Sepsis ise preterm AGA hastalarda %22.2, preterm SGA hastalarda % 7.7 oranında görülmekte idi. Mortalite açısından gruplara baktığımızda ise preterm AGA hastalarda mortalite %8.9 iken, preterm SGA hastaların hiçbiri ölmemişti.

Preterm AGA ile preterm SGA grupları arasında cinsiyet, doğum şekli, entübasyon, pnömotoraks, intrakraniyal kanama, sepsis, mortalite oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 6).

Gruplara göre sürekli klinik değişkenler (gebelik yaşı, doğum ağırlığı, plasenta ağırlığı, 1., 5. dakika Apgar skorları, SNAPPE-II değerleri ve CPAP, entübasyon ve yatış süreleri) Tablo 7, Şekil 6'da gösterilmiştir.

Preterm AGA bebeklerin ortalama gebelik yaşı  $31.9\pm 3,5$  (24-36) hafta, ortalama doğum ağırlığı ise  $1902\pm 770$  (710-4100) gram, ortalama plasenta ağırlığı  $459.7\pm 310$ (270-910) gram olarak saptandı. Preterm SGA olan hastaların ortalama gebelik yaşı  $33.0\pm 2,1$  (30-36) hafta, ortalama doğum ağırlığı  $1478\pm 367$  (950-2440) gram, ortalama plasenta ağırlığı ise  $390.6\pm 240$  (230-520) gram olarak saptandı. Doğum ağırlığı ve plasenta ağırlığı preterm SGA grubunda anlamlı derecede düşük saptandı ( $p<0,05$ ).

Preterm AGA hastaların ortalama yatış süresi 11,5 (1-124) gün, ortalama entübasyon süresi 88 (2.5-384) saat, ortalama CPAP süresi ise 28 (1-173) saat olarak bulundu. Preterm SGA olan hastaların ortalama yatış süresi 17 (1-40) gün, ortalama entübasyon süresi 14 (4-146) saat, ortalama CPAP süresi ise 39.5 (32-50)

saat olarak saptandı. Her iki grup arasında yatış, entübasyon ve CPAP süreleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Preterm AGA hastalarda ortalama SNAPPE-II değeri  $32.3 \pm 25.7(5-93)$ , preterm SGA olanlarda ise  $32.2 \pm 20.6(5-68)$  idi. Apgar değerlerinin ortalama değerleri ise sırası ile 1 ve 5. dakika olmak üzere preterm AGA hastalarda  $6.7 \pm 2.3$ ;  $8.4 \pm 1.6$  preterm SGA olanlarda ise  $5.3 \pm 2.0$ ;  $7.7 \pm 1.7$  olarak saptandı. Her iki grup arasında SNAPPE-II ve Apgar skorları açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

**Tablo 6 . Gruplara Göre Klinik Değişkenler**

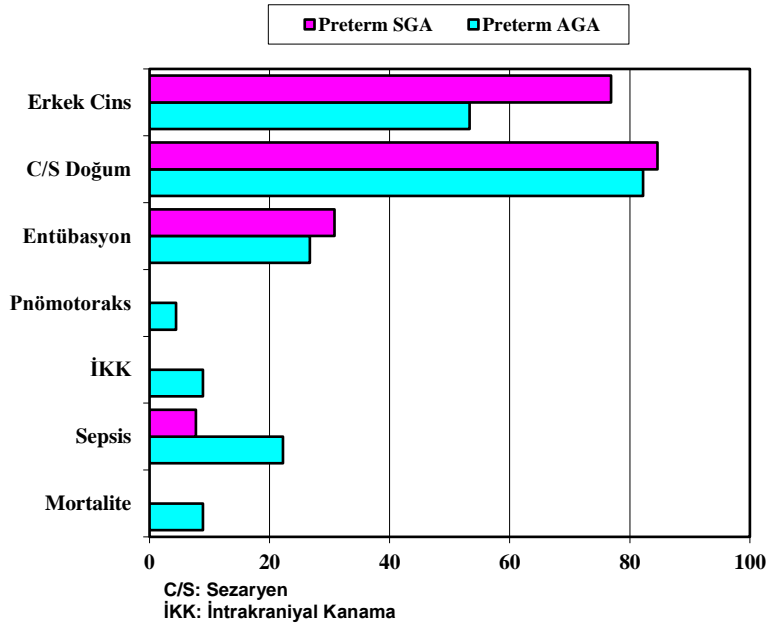
		Preterm AGA Grubu (n:45)	Preterm SGA Grubu (n:13)	P değeri
		%	%	
Cinsiyet	Kız	46,7	23,1 <sup>a</sup>	
	Erkek	53,3	76,9	
Doğum Şekli	NVY	17,8 <sup>c</sup>	15,4 <sup>b</sup>	
	C/S	82,2	84,6	
Entübasyon		26,7	30,8	0,771
Pnömotoraks		4,4	0	0,439
İntrakraniyal Kanama		8,9	0	0,265
Sepsis oranı		22,2	7,7	0,239
Mortalite oranı		8,9	0	0,265

C/S: Sezaryen SVY:Spontan vajinal yol

<sup>a</sup>Preterm SGA grubunda kız erkek farkı  $p= 0,006$

<sup>b</sup>Preterm SGA grubunda SVY ile C/S arasındaki fark  $p= 0,000$

<sup>c</sup> Preterm AGA grubunda SVY ile C/S arasındaki fark  $p=0,06$



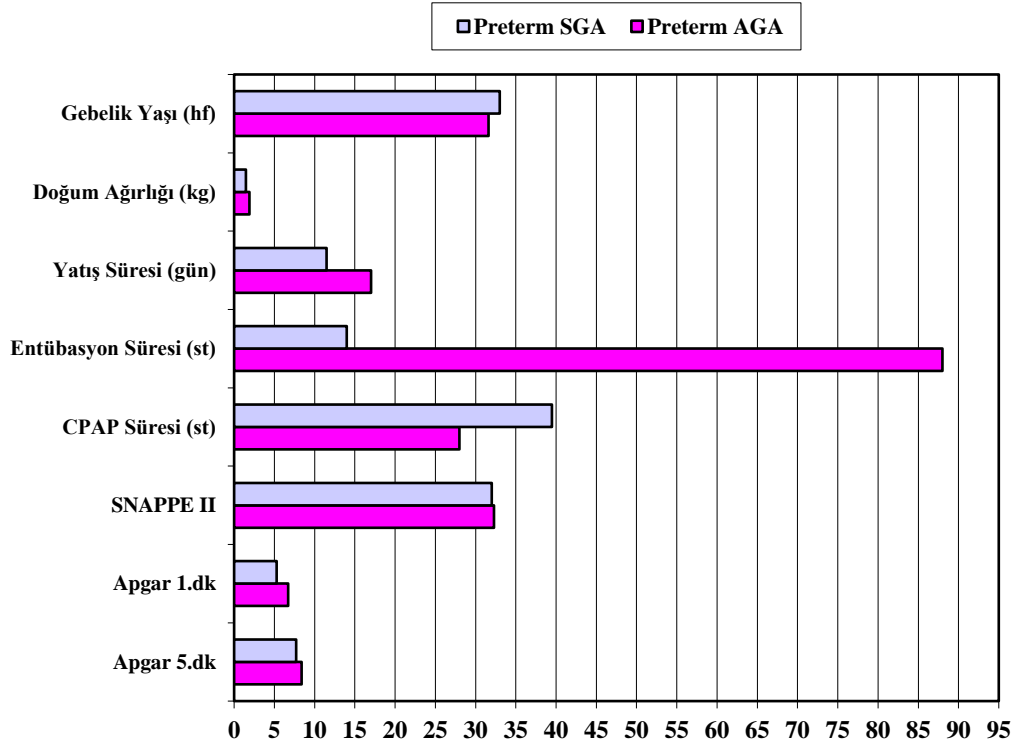
**Şekil 5. Gruplara Göre Klinik Değişkenler**



**Tablo 7. Gruplara Göre Sürekli Klinik Değişkenler**

		Ortalama SS	En Düşük	En Yüksek	Ortanca	P
<b>Gebelik Yaşı (Hf)</b>	Preterm AGA	31,9±3,5	24,00	36,00		0,072
	Preterm SGA	33,0±2,1	30,00	36,00		
<b>Doğum Ağırlığı (g)</b>	Preterm AGA	1902,4±770	710,0	4100,0		0,008
	Preterm SGA	1478,4±367	950,0	2440,0		
<b>Plasenta Ağırlığı (g)</b>	Preterm AGA	459,7±310	270,0	910,0		0,049
	Preterm SGA	390,6±240	230,0	520,0		
<b>Yatış Süresi (gün)</b>	Preterm AGA	-	1	124,0	11,5	0,611
	Preterm SGA	-	1,0	40,0	17	
<b>Entübasyon Süresi (saat)</b>	Preterm AGA	-	2,5	384,0	88	0,95
	Preterm SGA	-	4,0	146,0	14	
<b>CPAP Süresi (saat)</b>	Preterm AGA	-	1,0	173,0	28	0,737
	Preterm SGA	-	32,0	50,0	39,5	
<b>SNAPPE-II</b>	Preterm AGA	32,3±25,7	5,0	93,0		0,160
	Preterm SGA	32,0±20,6	5,0	68,0		
<b>APGAR 1/5 Dakika</b>	Preterm AGA	6,7± 2,3	2,0/5,0	9,0/10,0		0,5/ 0,13
	Preterm SGA	8,4±1,6	2,0/4,0	9,0/10,0		
		5,3±2,0				
		7,7±1,6				

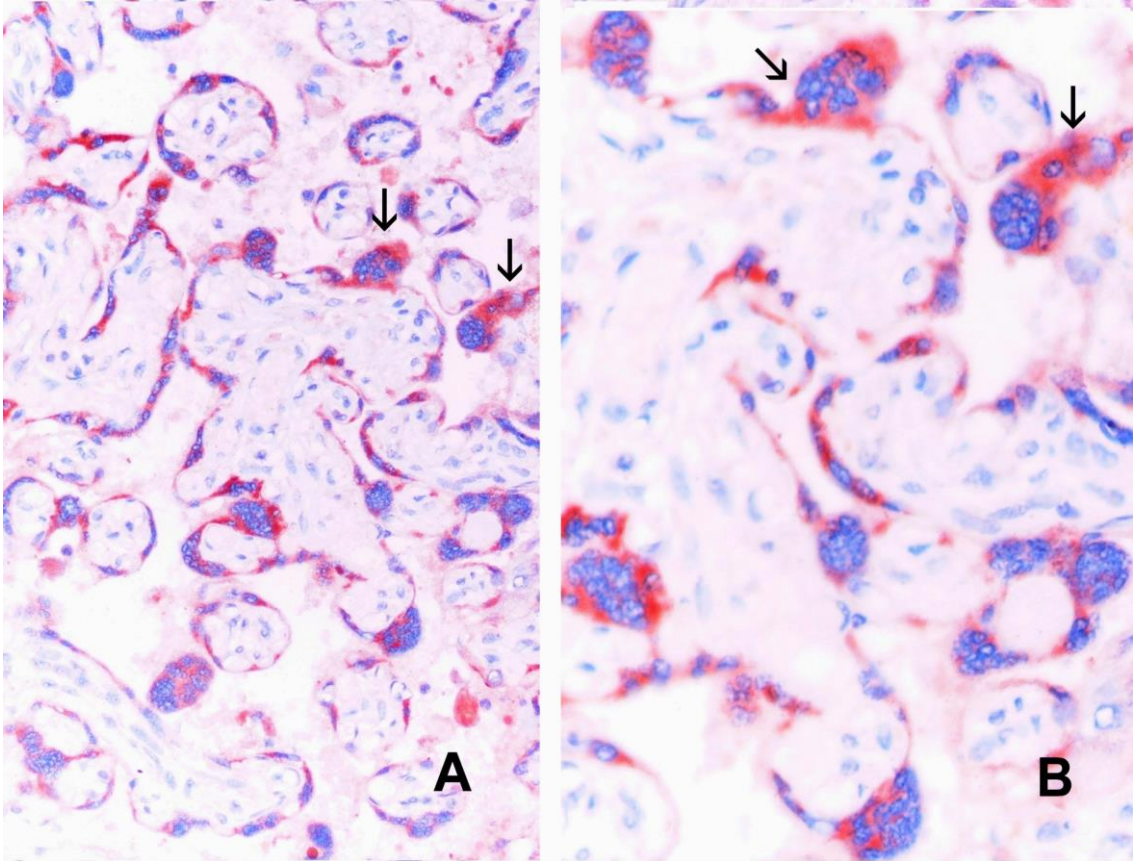
SS: Standart sapma



**Şekil 6. Gruplara Göre Sürekli Klinik Değişkenler**

### Gruplara Göre Plasental Apoptozis Göstergeleri

Preterm AGA, SGA ve sağlıklı term bebek grupları için plasental apoptozis göstergeleri ayrı ayrı belirlendi. Bcl-2, Bax ve M30 (Şekil 7) göstergelerinin her üçü de preterm AGA ve SGA gruplarındaki bebeklerde sağlıklı term bebeklere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (hepsi için  $p < 0,01$ ). Bax ve M30 göstergeleri aynı zamanda preterm SGA grubundaki bebeklerde preterm AGA grubundaki bebeklere göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p < 0,01$ ). Ancak antiapoptozis göstergesi olarak kabul edilen Bcl-2 göstergesi preterm AGA ve SGA gruplarındaki bebeklerde farklı değildi ( $p > 0,05$ ) (Tablo 8, Şekil 8).

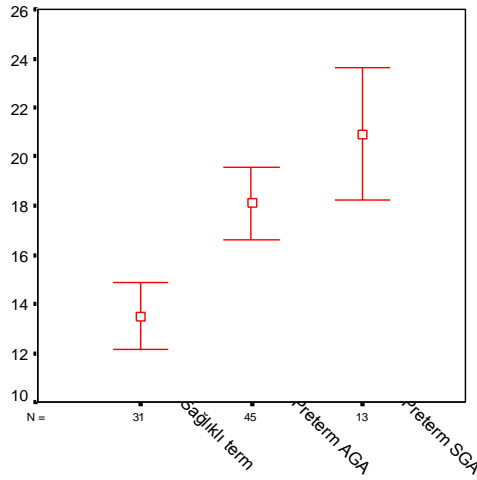
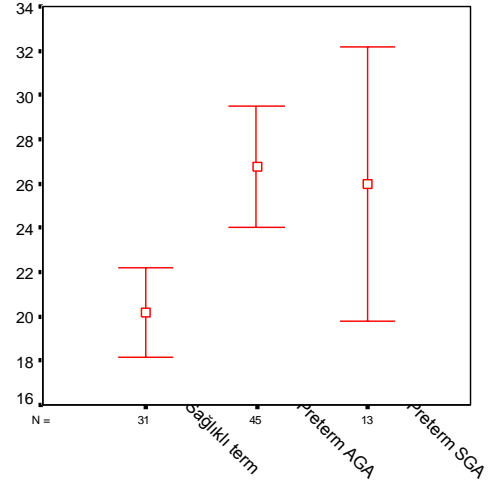
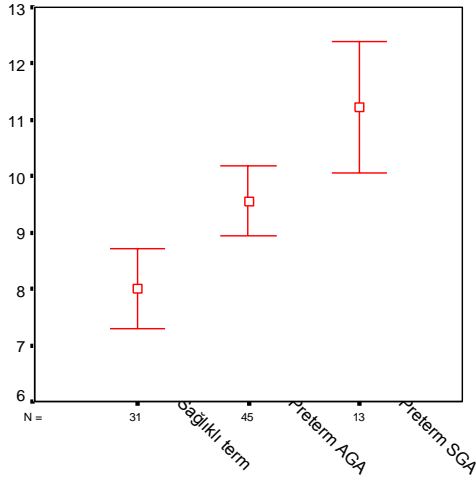


### Şekil 7. M30 ile Boyanan Apoptotik Trofoblastlar

A: Koryon villuslarını döşeyen sito ve sinsityotrofoblastlarda M30 ile güçlü sitoplazmik boyanma, (kırmızı renkte ok ile işaretli, x10), B: Aynı hücrelerin daha yakından görünümü (x40).

**Tablo 8. Grupların Göre Ortalama Plasental Apoptozis Göstergeleri**

(%)		N	Ortalama SS	En düşük	En yüksek	P
<b>Bcl-2</b>	Sağlıklı term	31	20,1±5,4	8	36	0,008
	Preterm AGA	45	26,7±9,1	16	58	
	Preterm SGA	13	26,0±10,2	19	32	
<b>Bax</b>	Sağlıklı term	31	8,8±1,9	6	12	0,000
	Preterm AGA	45	9,6±2,0	4	14	
	Preterm SGA	13	11,2±1,9	10	12	
<b>M30</b>	Sağlıklı term	31	13,5±3,7	10	28	0,000
	Preterm AGA	45	18,1±4,8	10	32	
	Preterm SGA	13	20,9±4,4	18,2	23,6	



**Şekil 8. Gruplara Göre Plasental Apoptozis Göstergeleri**

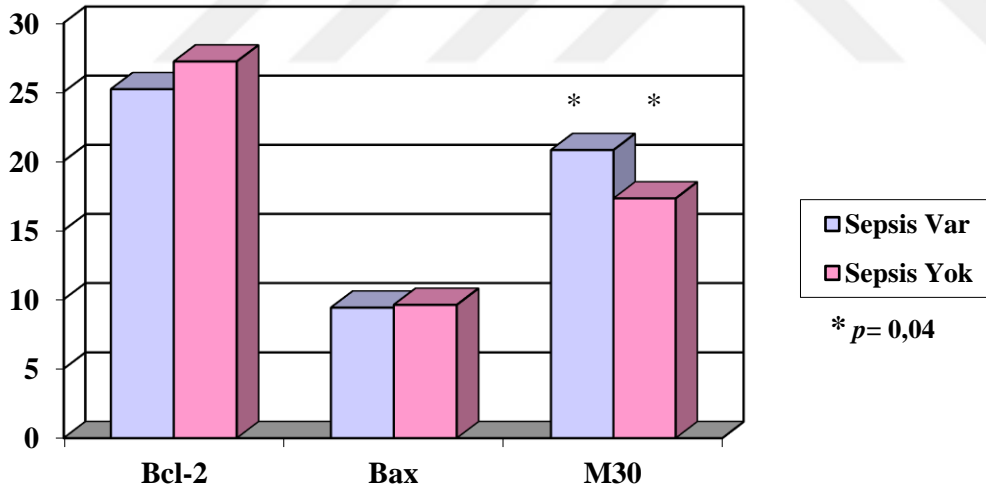
### Plasental Apoptozis Göstergelerinin Klinik Değişkenlerle İlişkisi

Preterm AGA ve preterm SGA gruplarında doğum şekli, cinsiyet, intrakranial kanama, pnömotoraks ve mortalite açısından apoptozis göstergeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sadece preterm AGA grubunda daha sonra sepsis gelişen bebeklerin plasentalarında M30 ile gösterilen apoptozis yüzdesi, sepsis gelişmeyen bebeklerdekinden anlamlı şekilde daha yüksekti ( $p < 0,05$ ) (Tablo 9, Şekil 9).

**Tablo 9. Apoptozis Göstergeleri İle Preterm Hastalarda Sepsis Gelişimi Arasındaki İlişki**

		Bcl-2	Bax	M30
Sepsis	Var (n:10)	25.2 ± 5.51	9.4 ± 1.8	20.8 ± 1.9*
	Yok (n:35)	27.2 ± 9.3	9.6 ± 2.1	17.3 ± 5.1*

\*P değeri: 0.04



**Şekil 9. Apoptozis Göstergeleri İle Preterm Hastalarda Sepsis Gelişimi Arasındaki İlişki**

### Plasental Apoptozis Göstergelerinin Sürekli Klinik Değişkenler İle İlişkisi

Preterm AGA ve preterm SGA hasta gruplarında bebeklerin klinik durumlarının objektif göstergesi olan SNAPPE-II ve M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p < 0,001$ ). Fakat benzer bir ilişki bax ve bcl-2 ile saptanamadı.

Preterm AGA hasta grubunda 1. ve 5. dakika Apgar değerlerinin, M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi ile anlamlı negatif korelasyonu olduğu saptandı (1. ve 5.dk Apgar skorları için sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,002$ ). Preterm SGA grubunda ise sadece 5. dakika Apgar skoru ve M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu görüldü ( $p=0,045$ ). Apgar skorları ile Bcl-2 ve Bax arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Preterm AGA hastaların hastanede yatış süresi ve M30 ile gösterilen plasental apoptozis arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ). Benzer bir ilişki Bcl-2 ve Bax ile gösterilemedi. Preterm SGA grubunda ise yatış süresi ile hiçbir apoptotik gösterge arasında ilişki saptanamadı.

Entübasyon ve CPAP süreleri ile, M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında preterm AGA hasta grubunda anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,038$ ).

Doğum ağırlığı ve M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi preterm AGA ve preterm SGA gruplarında anlamlı bir Şekilde negatif korelasyon gösteriyordu ( $p<0,001$ ).

Plasenta ağırlığı ile ilişkiye baktığımızda ise preterm AGA hasta grubunda M30 ile gösterilen apoptozis yüzdesi arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı ( $p=0,001$ ).

### **SNAPPE-II İle Klinik Değişkenler Arasındaki İlişki**

Doğum Şekli (C/S, NVY) açısından bakıldığında hasta gruplarının SNAPPE-II değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı.

Cinsiyet açısından ise sadece preterm AGA grubunda erkeklerin SNAPPE-II değerleri kızlarınkinden anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,007$ )

Prematüre AGA grubunda olup, daha sonra sepsis ya da intrakranial kanama gelişen veya eksitus olan bebeklerin SNAPPE-II değerlerinin sepsis veya intrakranial kanama gelişmeyen ve yaşayan bebeklere göre anlamlı Şekilde yüksek olduğu saptandı ( $p<0,001$ ) (Tablo 10). Benzer Şekilde hem preterm AGA hem de preterm SGA gruplarında entübe edilen veya CPAP uygulanan hastaların SNAPPE-II değerleri entübe olmayan veya CPAP uygulanmayan hastaların SNAPPE-II değerlerinden anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ( $p<0,05$ ). Pnömotoraks gelişen ve gelişmeyen grupların SNAPPE-II değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

## SNAPPE-II İle Sürekli Klinik Değişkenler Arasındaki İlişki

SNAPPE-II ile preterm AGA bebeklerin yatış süreleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu görüldü ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde preterm AGA ve preterm SGA hastaların mekanik ventilasyon süreleri ile SNAPPE-II değerleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmaktaydı ( $p<0,001$ ). CPAP süreleri ile ise sadece preterm AGA bebeklerin SNAPPE-II değerleri ile aralarında anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmakta idi ( $p<0,001$ )

Preterm AGA ve preterm SGA gruplarında doğum ağırlığı ile SNAPPE-II arasında anlamlı bir negatif korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ).

Plasenta ağırlığı ile ise sadece preterm AGA hasta grubunda SNAPPE-II ile anlamlı bir negatif korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ).

SNAPPE-II ile 1. ve 5. dakika Apgar skorları arasındaki ilişkiyi irdelediğimizde ise aralarında anlamlı bir negatif korelasyon olduğu saptandı ( $p<0,001$ ).

**Tablo 10. SNAPPE-II ile Klinik Değişkenler Arasındaki İlişki**

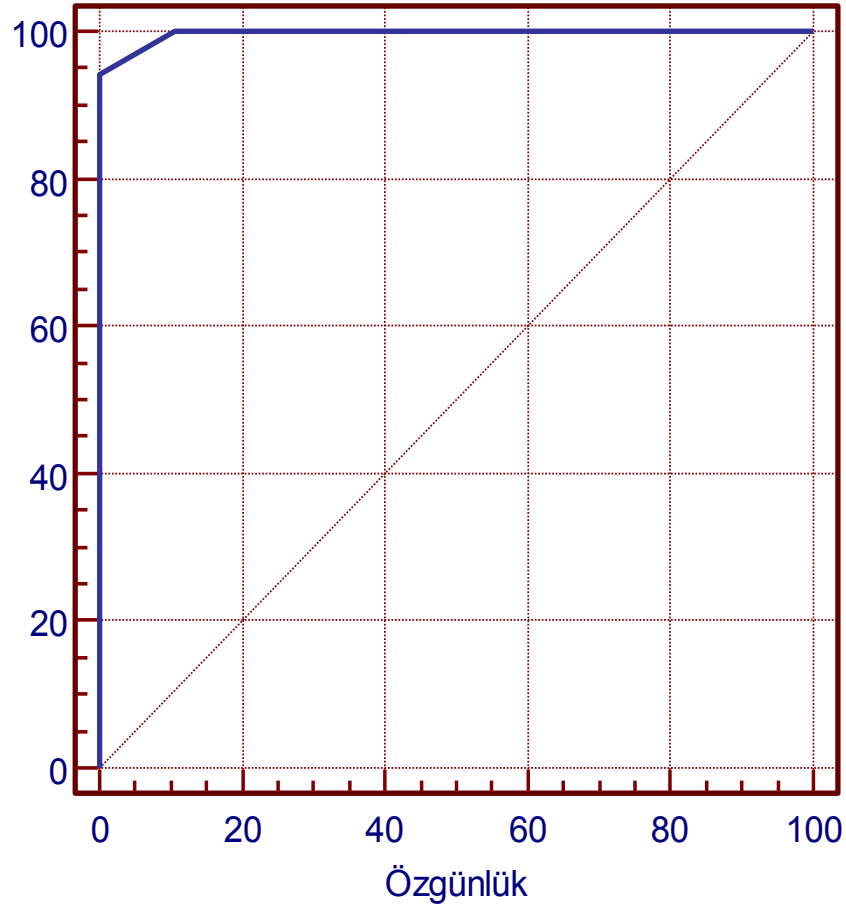
		N	Ortalama SNAPPE	P değeri
Preterm AGA	Sepsis Gelişen	10	50.2	0,000
	Sepsis Gelişmeyen	35	11.5	
Preterm SGA	Sepsis Gelişen	1	57	-
	Sepsis Gelişmeyen	12	24.8	
Preterm AGA	Eksitus Olan	4	66	0,000
	Yaşayan	41	15.6	
Preterm SGA	Eksitus Olan	0	-	-
	Yaşayan	13	27.3	
Preterm AGA	İKK Geçiren	4	52.2	0,007
	İKK Geçirmeyen	41	17.0	
Preterm SGA	İKK Geçiren	0	-	-
	İKK Geçirmeyen	13	27.3	

İKK: İntrakraniyal Kanama

## Düşük ve Yüksek Risk Gruplarında Klinik Değişkenler

Hastalar aldıkları SNAPPE-II puanlarına göre düşük risk ve yüksek riskli olarak ayrıldı. Bu grupları belirlemek için entübe edilme durumuna göre ROC eğrisi kullanıldı. SNAPPE-II değeri  $\leq 28$  olan hastalar düşük riskli, SNAPPE-II değeri  $>28$  olanlar ise yüksek riskli hastalar olarak belirlendi. Bu değerlerin duyarlılığı %94,1, özgünlüğü ise %100, pozitif tahmin değeri %100, negatif tahmin değeri ise %97.9 idi.

## SNAPPE-II



**Şekil 10. Entübe Edilme Durumuna Göre Üretilen ROC Eğrisi**

Düşük riskli hastaların %2,3'ü entübe edilirken , yüksek riskli hastaların %100'ü entübe edilmişti ( $p<0,001$ ). Düşük riskli hastaların %2,3'ünde sepsis gözlenirken yüksek riskli hastaların %66,7'inde sepsis gözlendi ( $p<0,001$ ). Sepsis gözlenme oranı düşük riske göre, yüksek riskli hastalarda 84 kat daha fazla saptandı(  $P<0,001$ ) (Tablo 11, Şekil 11).

Yüksek riskli hastalarda ölüm oranı %26,7 iken, düşük riskli hastaların hiçbirinde ölüm gözlenmedi ( $p<0,05$ ). Düşük riskli hastalarda intrakranial kanama %2,3 iken, yüksek riskli hastalarda %20 olarak saptandı ( $p<0,05$ ). Yüksek riskli hastalarda intrakranial kanama riski düşük riskli gruptaki hastalara göre 10,5 kat daha fazla idi. Pnömotoraks sadece yüksek riskli hastalarda %13,3 iken, düşük riskli hastalarda hiç gözlenmedi (Tablo 11, Şekil 11).

Sezaryen ile doğanların % 77.1'i yüksek riskli grupta, % 22.9'u düşük riskli gruptaydı.

Kızların % 87,5'i düşük riskli grupta iken % 12,5'i yüksek riskli grupta yer alıyordu. Erkeklerin ise % 64.7'si düşük riskli grupta iken % 35.3'ü yüksek riskli grupta yer alıyordu ( $p<0,05$ ). Erkek hastaların yüksek riskli grupta olma olasılıkları 3,8 kat daha fazla olarak saptandı ( $p<0,05$ ) (Tablo 11, Şekil 11).

**Tablo 11. Düşük ve Yüksek Riskli Gruplarda Klinik Değişkenler ve Risk Katsayıları**

	Düşük Riskli Hastalar (SNAPPE $\leq 28$ )	Yüksek Riskli Hastalar (SNAPPE $>28$ )	<i>p</i> değeri	RK*
	%	%		
Entübasyon Oranı (%)	2,3	100	< 0,001	-
Sepsis (%)	2,3	66,7	< 0,001	84
Ölüm Oranı (%)	0	26,7	< 0,001	-
İntrakranial kanama oranı (%)	2,3	20	<0,05	10,5
Pnomotoraks oranı (%)	0	13,3	<0,05	-

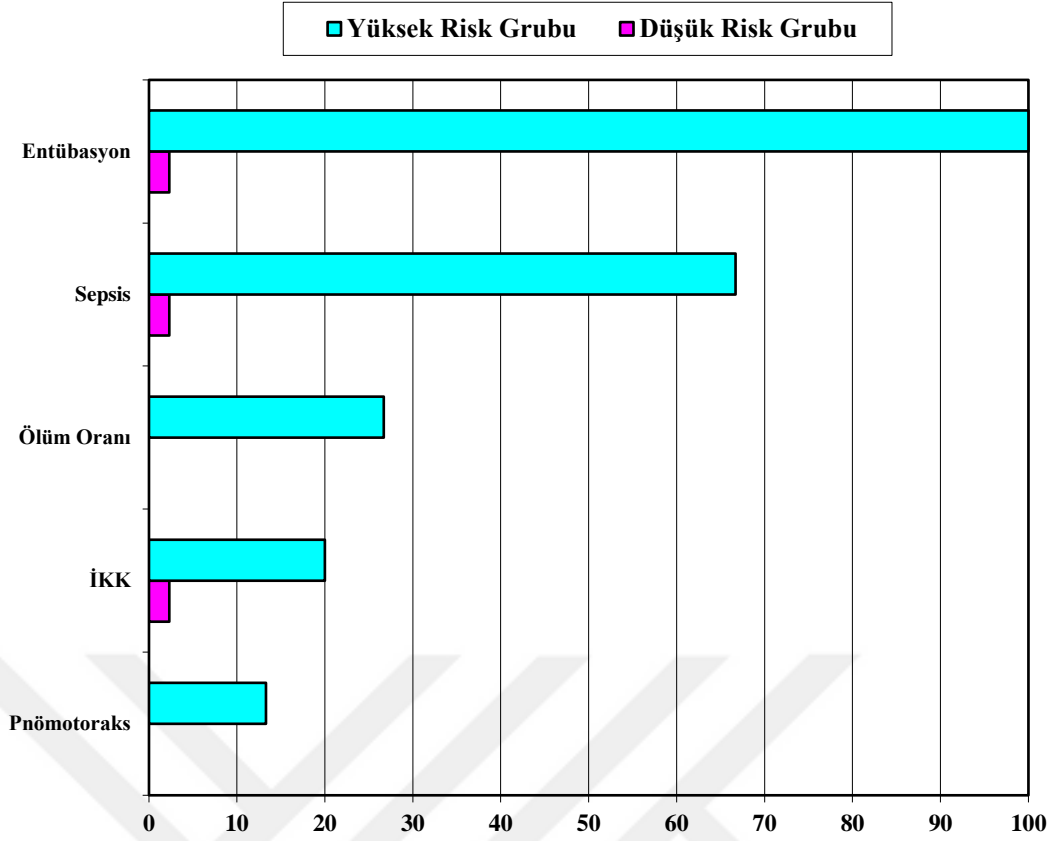
\*Risk Katsayısı

### Düşük ve Yüksek Risk Gruplarında Sürekli Klinik Değişkenler

Düşük riskli hastalarda Bax ile boyanma yüzdesinin ortalaması 30.1, yüksek riskli hastalarda 27.6 ( $p>0,05$ ), Bcl-2 ile boyanma yüzdesinin ortalaması düşük riskli hastalarda 29.1, yüksek riskli hastalarda ise 30.6 ( $p>0,05$ ) bulundu. Fakat M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesinin ortalaması yüksek riskli hasta grubunda 21.3 iken, düşük riskli hasta grubunda 17 olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0,001$ ).

Düşük riskli hastaların ortalama gebelik yaşı  $32.8\pm 2.7$  (26-36) hafta, ortalama doğum ağırlığı  $2023\pm 681$  (1100-4100) gram, ortanca yatış süresi 10.5 (1-58) gün, ortanca CPAP süresi ise 26 (1-50) saat olarak saptandı, bu grupta sadece 1 hastaya 123 saat mekanik ventilasyon uygulanmıştı (Tablo 12, Şekil 12).





**Şekil 11. Düşük ve Yüksek Riskli Gruplarda Klinik Değişkenlerin Oranları**

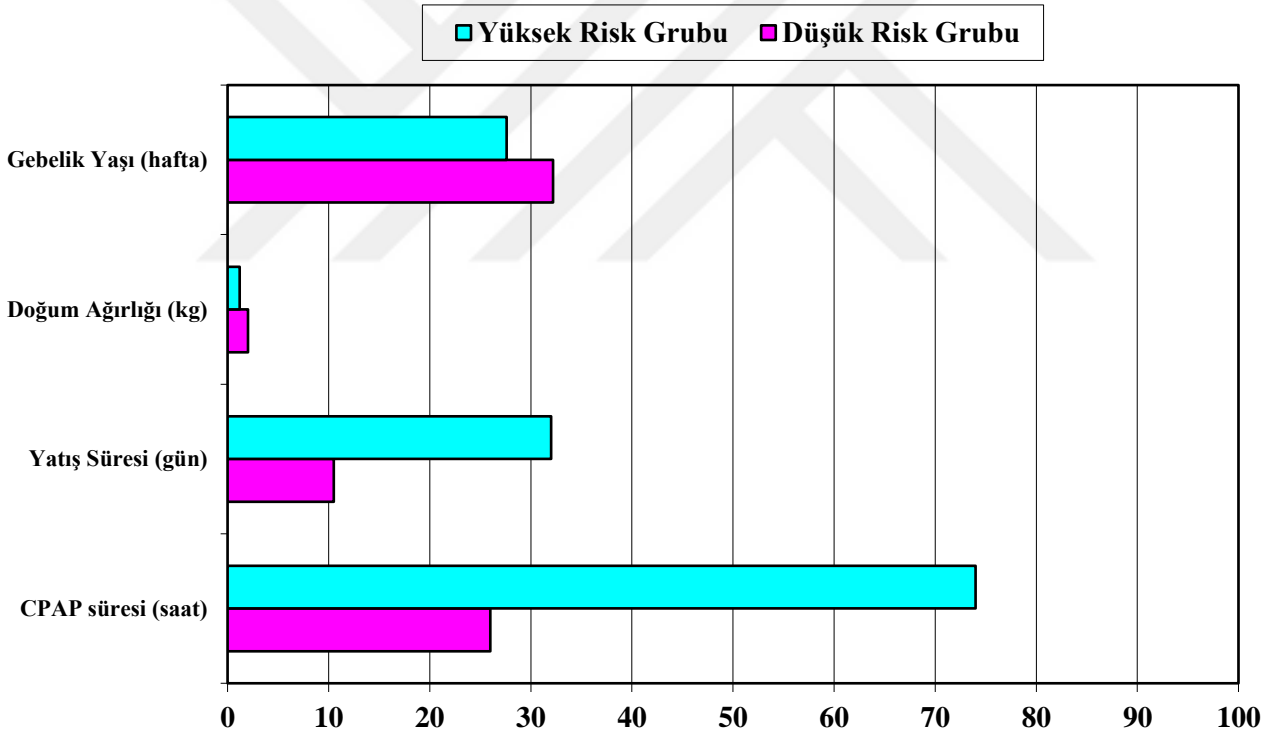
Yüksek riskli hastaların ise ortalama gebelik yaşı  $29.3 \pm 3,5$  (24-35) hafta, ortalama doğum ağırlığı  $1189 \pm 410$  (710-2270) gram, ortanca yatış süresi 32 (1-124) gün, ortanca mekanik ventilasyon süresi 72 (2,5-384) saat, ortanca CPAP süresi 74 (16-173) saat olarak bulundu (Tablo 12, Şekil 12).

Yüksek risk gruplarındaki hastaların gebelik haftası düşük risk grubundaki hastalara göre anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0,001$ ). Yüksek risk grubundaki hastaların doğum ağırlığı da düşük risk grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,001$ ).

Düşük risk grubundaki hastaların mekanik ventilasyon, CPAP ve yatış süreleri, yüksek risk grubundaki hastalara göre anlamlı derecede düşüktü (sırası ile  $p:0,000$ ,  $p:0,005$ ,  $p:0,003$ )

**Tablo 12. Düşük ve Yüksek Riskli Hasta Gruplarına Göre Sürekli Klinik Değişkenler**

	SNAPPE-II	N	Ortalama SS	Ortanca	P Değeri
<b>Gebelik yaşı (hafta)</b>	≤ 28	43	32,8±2,7		0,000
	> 28	15	27,8±3,9		
<b>Doğum Ağırlığı (gr)</b>	≤ 28	43	2023±681		0,000
	> 28	15	1189±410		
<b>Yatış Süresi (gün)</b>	≤ 28	43	-	10,5	0,003
	> 28	15	-	32,0	
<b>CPAP Süresi (saat)</b>	≤ 28	43	-	26	0,005
	> 28	15	-	74	



**Şekil 12. Düşük ve Yüksek Risk Hasta Gruplarına Göre Klinik Değişkenler**

## TARTIŞMA

Dünya genelinde yenidoğan ölümlerinin büyük bir çoğunluğu doğumda veya doğumdan kısa süre sonra olan komplikasyonlara bağlı gelişmektedir. Bütün bebek ölümlerinin yaklaşık yarısı doğumu izleyen ilk ayda, dördte biri ise ilk hafta içinde meydana gelmektedir<sup>1</sup>. Ülkemizde perinatal mortalite ve morbiditeye yönelik geniş kapsamlı ve güncel veriler bulunmamaktadır. Prematürite ve düşük doğum ağırlığı perinatal ölüm nedenleri arasında çok önemli bir yer tutmaktadır<sup>1</sup>.

Erken doğum insidansı toplumların sosyoekonomik ve kültürel gelişmişlik düzeylerine göre değişkenlik göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde tüm canlı doğumların %4-8'inin prematürite ile sonuçlandığı bildirilmektedir. Ülkemiz için belirlenmiş sağlıklı bir istatistik bulunmamasına rağmen her yıl yaklaşık yüz bin prematüre bebeğin doğduğu tahmin edilmektedir. Prematüre bebeklerin morbidite ve mortalite oranlarının zamanında doğan bebeklerinkinden çok daha yüksek olduğu ve neonatal mortalitenin önemli bir kısmının prematüre bebek ölümlerine bağlı olduğu bilinen bir gerçektir<sup>53</sup>.

Yenidoğan yoğun bakım şartları gelişmiş olmasına rağmen, intrauterin gelişme geriliğinde neonatal mortalite hala yüksek oranlardadır. Gelişme geriliği bulunan bebekler glikojen ve yağ depoları yetersiz olduğu için özellikle hipotermi ve hipoglisemiye yatkındır. Bu hastaların bakımı ve tedavisi özel ilgi gerektirir. Asıl önemli olan ise bu doğumları azaltabilmektir. Bunun için ise neden olan faktörlerin belirlenmesi ve engellenmesi temel ilke olmalıdır<sup>56</sup>.

Prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin klinik durumları ve prognozları bebeğin kendine, annesine ve plasentaya ait faktörlerden etkilenmektedir. Bebeği kötü yönde etkileyen plasental faktörlerin başında trofoblastik hücrelerin kaybı gelmektedir. Trofoblastik hücreler nekroz ya da apoptozis yoluyla ölebilirler. Plasentadaki nekroz her koşulda patolojik olarak kabul edilirken, apoptozis bazı durumlarda fizyolojik olarak kabul edilmektedir.

Plasental apoptozisin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü halen netlik kazanmamış ve üzerinde araştırma yapılan bir konudur. Plasental apoptozisin derecesi değişkenlik göstermektedir. Normal gebelerin plasentalarında fizyolojik olarak apoptozisin varlığı gösterilmiştir<sup>3,7</sup>. Plasental apoptozisin gebelik haftası ilerledikçe arttığını<sup>3</sup> iddia edenler yanında ilk trimesterde daha fazla olduğunu ileri sürenler de vardır<sup>8</sup>. Gebelik haftası ilerledikçe plasental yaşlanma ile birlikte artan apoptozisin plasentanın yeniden yapılması için bir fırsat sağladığı ve

sitotrofoblastlarda gözlenen apoptozis alanlarının plasentada madde alışverişini daha kolay hale getirdiği ve aynı zamanda 9/1 olan sinsityotrofoblast/sitotrofoblast oranının korunduğu iddia edilmektedir<sup>7</sup>.

Plasentanın fizyolojik yaşlanmasından farklı olarak preeklampsi ve İUGG ile komplike olmuş gebeliklerde plasental apoptoziste bir artış olduğu bildirilmiştir<sup>51,52</sup>. Benzer şekilde erken doğum ile sonuçlanan gebeliklerin plasentalarındaki apoptozis oranının artmış olduğu ileri sürülmektedir<sup>7,57</sup>.

Bizim çalışmamızda da preterm AGA, preterm SGA olan bebeklerin plasentalarında zamanında doğan ve sağlıklı bebeklerin plasentalarına göre artmış apoptozis saptandı (Tablo 8, Şekil 8). Preterm hastaların plasentalarında apoptozisin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşadık. Erken doğuma neden olabilen bir çok faktör plasentadaki apoptozis derecesini etkileyebilir. Bizim hasta grubumuzda saptadığımız plasental apoptozis yüzdesini, gebelik yaşı uyumlu ve tamamen normal seyreden bir gebenin plasental apoptozis yüzdesi ile karşılaştırma şansımız yoktu. Bu yüzden preterm hastalarda artmış olarak saptadığımız apoptozis herhangi bir hastalık ile komplike olmamış term hasta grubuna göre söylendi. Gebelik yaşı ilerledikçe plasental apoptozisin arttığı, başka bir deyişle preterm bebeklerdeki plasental apoptozis yüzdesinin zamanında doğan bebeklerdeki plasental apoptozis yüzdesinden daha düşük olması gerektiği düşünüldüğünde bizim preterm hasta grubumuzdaki artmış plasental apoptozisin anlamlı olabileceği düşünülebilir. Gözlenen bu artmış plasental apoptozis yüzdesinin bu bozukluklara (prematürite, İUGG, ) yol açan patolojik olayların bir sonucu mu, yoksa etyolojik bir komponenti mi olduğu hakkında net bir görüş ileri sürmek şimdilik mümkün değildir. Her ne şekilde olursa olsun plasentadaki apoptozis artışının bebeğin klinik durumunu ve prognozunu nasıl etkileyeceğine dair bir bilgi veya yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

İUGG normalden az perfüze olan bir plasenta ve kronik hipoksiye neden olan klinik durumlar (maternal anemi, sigara içmek ve preeklampsi)<sup>58</sup> varlığında ortaya çıkabilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada preeklampsi ile komplike olmuş gebeliklerden alınan plasentada yaygın sitotrofoblastik apoptozis görülmesine karşılık normal kontrollerden alınan örneklerde çok az veya hiç apoptozis görülmemiştir<sup>59</sup>.

İUGG ile komplike olmuş gebeliklerde artmış plasental apoptozisin nedeni hipoksi olabilir. Hipoksi farklı dokularda da apoptozisi indükleyen nedenlerden biridir ve gebelikte meydana gelen plasental hipoksi apoptozisi tetikleyebilir<sup>60,61</sup>. Bizim hasta grubumuzda İUGG olan bebeklerin plasentalarındaki artmış apoptozis de benzer şekilde açıklanabilir.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde bir çok yöntem kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin göreceli olarak ayırt ettirici morfolojik özellikleri olmakla birlikte onları tanımlamak güçtür. Apoptotik hücreler ışık mikroskopisi ile sayıldığında elde edilecek değer bakan kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. Apoptozisi değerlendiren patologun hastanın klinik bilgilerine sahip olması da sonucu etkileyebilir. Bizim çalışmamızda tüm plasentalar aynı ve hastalar haklarında hiçbir bilgiye sahip olmayan bir patolog tarafından değerlendirilmiştir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında elektron mikroskopisi halen altın standart olma özelliğini korumaktadır<sup>62</sup> ancak çalışmamızda bu yöntemi kullanabilme olanağı bulunamamıştır.

Biz bu çalışmada apoptozis göstergesi olarak bax ve M30, antiapoptozis göstergesi olarak da bcl-2 immünohistokimyasal yöntemleri kullandık. M30 ile boyama yönteminin TUNEL'e göre bazı üstünlükleri de mevcuttur:

1-Normal bir dokuda TUNEL pozitif nükleusların insidansı genellikle çok düşüktür. Bu kantitatif hesaplamalar sırasında güçlüğe neden olmaktadır. Aksine M30 ile boyanan apoptotik hücrelerin sayısı TUNEL ile boyananlara göre daha yüksektir. Bunun sebebi apoptotik kaskad sırasında endonükleaz aktivasyonunun olduğu periyodun kısalığına karşılık sitokeratin parçalanmasının olduğu periyodun çok uzun olmasıdır<sup>46</sup>

2-TUNEL testinin her doku için adapte edilmesi gerekmektedir ve her zaman aynı dokuda benzer sonuçlar vermeyebilir,<sup>50,39,63</sup> bu durum M30 için geçerli değildir.

3-Her geç apoptotik nükleusta TUNEL pozitifliği oluşmayabilir. Çünkü endonükleaz aktivasyonu ya oluşmayabilir<sup>45</sup> veya TUNEL pozitifleşmeden önce nükleus çıkabilir<sup>39,46</sup>. Aksine M30 immün reaksiyonun kullanımı çok kolaydır. Kolaylıkla tekrar edilebilir ve endonükleaz aktivasyonundan bağımsızdır. Bu nedenlerden dolayı plasental apoptozisin gösterilmesi için Bax'a ek olarak M30'u kullanmayı tercih ettik.

M30 ile saptadığımız apoptozis yüzdesinin sürekli klinik değişkenler ve sepsis ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisini saptamamıza rağmen bax ile benzer korelasyonu bulamadık. Bunun nedeni M30'un plasental dokuda apoptozisi göstermede bax'tan daha spesifik olması olarak düşünüldü.

Plasental apoptozisin hastaların klinik durumları üzerine olan etkisini değerlendirebilmek için öncelikle bebeğin klinik durumunu gösteren objektif kriterlere ihtiyaç vardı. Bunun için hastaların sadece ilk 12 saatteki bulgularına dayanarak değerlendirmenin yapıldığı SNAPPE-II'yi kullandık. Böylece kendi klinik uygulamalarımız veya bebeklerin tedavi edildikleri ortama ait değişkenlerin bebeklerin klinik durumları üzerine olan etkisini bir miktar azaltmış olduk. Bu etkileri tamamen dışlamak imkansızdı ancak bebeklerin doğdukları andan itibaren aynı ekip tarafından takip edilmeleri ve ünitemizdeki uygulamaların standardize edilerek yazılı hale getirilmiş olması uygulamalardan doğacak farklılıkları en az düzeye indirmiştir. Buna rağmen plasental apoptoz ile 12 saatten daha sonra meydana gelen olayların (ölüm, sepsis, intrakranial kanama, pnömotoraks, mekanik ventilasyon süresi, CPAP süresi vb.) ilişkilendirilmesi çevresel faktörlerin etkisi ile daha güç olabilir. Apoptozis ile bu parametreler arasındaki ilişkiyi değerlendirirken bu durumun dikkate alınması gerekir.

Hasta gruplarının plasental apoptozis oranlarına baktığımızda preterm AGA ve preterm SGA olan bebeklerde oldukça yüksek olarak bulduk. Bu yüksekliğin klinik olarak anlamını değerlendirmek için SNAPPE-II ile ilişkisine baktığımızda ise çok güçlü bir pozitif korelasyon saptadık. Bu da bizim başlangıçta ileri sürdüğümüz hipotezi doğrular nitelikteydi. Plasental apoptozis arttıkça ilk 12 saatte değerlendirdiğimiz SNAPPE-II'nin de artıyor olması, SNAPPE-II'nin arttıkça da bebeğin prognozunun kötü olduğunun daha önceden kanıtlanmış olması, artmış plasental apoptozis ile kötü prognozun ilişkilendirilmesini mümkün kılmaktadır. Hem preterm AGA hem de preterm SGA gruplarında plasental apoptozis arttıkça bebeklerin hastanede yatış süresi ve ventilatöre bağlı kalma sürelerinin arttığı, doğum ağırlığı, plasenta ağırlığı ve Apgar değerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü.

Preterm AGA ve preterm SGA gruplarında doğum şekli, cinsiyet, intrakranial kanama, pnömotoraks ve mortalite açısından bakıldığında apoptozis yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Sadece preterm AGA hasta

grubunda daha sonra sepsis gelişen bebeklerde plasental apoptozis sepsis gelişmeyen bebeklerden anlamlı bir şekilde yüksekti ( $p<0,05$ ). Plasental apoptozis oranı yüksek olan bebeklerde sepsis gelişme riskinin yüksek bulunması sepsis ile plasental apoptozis arasında direk bir ilişki olduğunu kanıtlamaz. Plasental apoptozis oranı yüksek olan bebeklerin SNAPPE-II değerleri de yüksek olduğundan bu bebeklere daha fazla girişim gerekeceği açıktır. Bu da bu bebeklerdeki sepsis riskini artırıyor olabilir. Benzer bir açıklamayı ventilatöre bağlı kalma süresi ve hastanede yatış süresi için de yapmak mümkündür.

Tüm yenidoğanları erken dönemde değerlendirmek için yaygın olarak kullandığımız Apgar skoru ile plasental apoptozis arasında negatif korelasyon olması da dikkat çekici idi. Plasentaldaki apoptozis arttıkça Apgar skorunun azalması, artmış plasental apoptozisin bebeğin klinik durumunun kötü yönde etkilendiğini gösteren bir diğer kanıt olarak değerlendirildi. Apgar skoru ile SNAPPE-II arasında da anlamlı pozitif bir korelasyon olması bu düşüncemizi destekliyordu. Plasental apoptozisteki artışın Bax ve M30 ile gösterilmesinin yanında apoptozisi engelleyen bir protein olarak bilinen Bcl-2'nin de artmış olması, yani apoptozisin bir yandan artarken diğer yandan da baskılanmaya çalışılması plasentalın kendini aşırı apoptoz etkisinden korumaya çalışıyor olabileceği fikrini uyandırmıştır. Bununla birlikte antiapoptotik bcl-2 proteininin gebelik boyunca plasentalın sinsityotroblastlarının sitoplazmasında yaygın olarak lokalize olduğunu ve hem term hemde preterm plasentalarda benzer yoğunlukta bulunduğu saptanmıştır<sup>47</sup>. Koryonik villüslerin sinsityotroblastlarında eksprese olan bcl-2 proteini, muhtemelen bu yapıları erken ölümden koruyan majör faktörlerden biridir. Bu fetusun gelişimi ve gebeliğin fizyolojik idamesi için vazgeçilmezdir<sup>47</sup>. Ayrıca term plasenta dokularının bcl-2 ekspresyonunun azaldığını bilinmektedir<sup>64</sup>. Bcl-2'nin primer rolü programlanmış hücre ölümü inhibisyonu olduğu için term plasentalarda azalması tutarlı olarak apoptozisi arttıracaktır<sup>3</sup>.

Preterm SGA bebeklerin bax ve M30 ile gösterilen apoptozis yüzde oranları, preterm AGA grubundaki bebeklerin yüzde oranlarından daha yüksek saptandı. Fakat preterm SGA grubunda plasental apoptozis oranları ile sürekli klinik değişkenler (yatış süresi, CPAP süresi, entübasyon süresi, 1. dakika Apgar

süresi) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun nedeni ise preterm SGA grubundaki hasta sayısının az olması ile ilişkili olabilir.

Plasental apoptozis bebeğin klinik durumu hakkında ipuçları vermekle birlikte annenin kronik hastalıklarında ve enfeksiyon durumunda oldukça fazla artmaktadır. Bu nedenle enfeksiyonu ve kronik hastalıkları bulunan annelerin plasentaları bu etkiyi en aza indirmek için çalışmadan çıkarıldı. Aynı zamanda çoğul gebeliklerin plasental apoptozisi nasıl etkilediği netlik kazanmadığından bu hastalar da çalışmaya alınmadı. Doğum odasındaki ölen bebekler ve konjenital anomalileri olan hastaların klinik durumlarını plasental apoptozisten farklı değişkenler etkileyebileceği için bu hastalar da çalışmada dışlandılar.

Entübe edilme kriteri kullanılarak oluşturulan ROC eğrisine göre SNAPPE-II'nin 28 ve altında olduğu bebeklerin düşük riskli, 28'in üstünde olduğu bebeklerin ise yüksek riskli olduğu bulundu. SNAPPE-II'nin 28'in üzerinde olduğu hastaların hastanede yatış süresi ve ventilatöre bağlı kalma süresinin belirgin olarak daha fazla olduğunu gördük. Aynı zamanda sepsis gözlenme riskinin 84 kat, intrakranial kanama riskinin 10.5 kat daha fazla oluşu dikkat çekici idi.

Sonuç olarak çoğunlukla incelenmeden atılan ve gebeliğin karakutusu olarak görülmesi gereken plasentada rutin incelemelere ek olarak apoptozisin değerlendirilmesi erken doğan bebeklerin klinik durumları ve prognozları hakkında değerli bilgiler verebileceği, plasental apoptozis oranının yüksek saptandığı preterm AGA ve preterm SGA bebeklerin klinik durumlarının daha ağır olabileceği kanısına varıldı.



## SONUÇLAR

- 1- Preterm AGA ve preterm SGA gruplarında plasental apoptozis oranı sağlıklı term bebeklerdeki orandan anlamlı bir şekilde yüksekti ( $p<0,001$ ) (Tablo 8).
- 2- Preterm AGA ve preterm SGA gruplarında doğum şekli, cinsiyet, intrakranial kanama, pnömotoraks ve mortalite açısından apoptozis göstergeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sadece preterm AGA grubunda daha sonra sepsis gelişen bebeklerin plasentalarında M30 ile gösterilen apoptozis yüzdesi, sepsis gelişmeyen bebeklerdekinden anlamlı şekilde daha yüksekti ( $<0,05$ ).
- 3- Preterm AGA ve preterm SGA hasta gruplarında bebeklerin klinik durumlarının objektif göstergesi olan SNAPPE-II ile M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p<0,001$ ).
- 4- Preterm AGA hasta grubunda 1. ve 5. dakika Apgar değerlerinin, M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi ile anlamlı negatif korelasyonu olduğu saptandı (1. ve 5.dk Apgar skorları için sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,002$ ). Preterm SGA grubunda ise sadece 5. dakika Apgar skoru ile M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu görüldü ( $p=0,045$ ).
- 5-Preterm AGA hastaların hastanede yatış süresi ile M30 ile gösterilen plasental apoptozis arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ).
- 6-Entübasyon ve CPAP süreleri ile M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi arasında prematüre AGA hasta grubunda anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,038$ ).
- 7-Doğum ağırlığı ile M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesi ile preterm AGA ve preterm SGA grupları arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı ( $p<0,001$ ).
- 8-SNAPPE-II ile preterm AGA bebeklerin yatış süreleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu görüldü ( $p<0,001$ ).
- 9-Preterm AGA ve preterm SGA hastaların mekanik ventilasyon süreleri ile SNAPPE-II değerleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon saptandı ( $p<0,001$ ). CPAP süreleri ile ise sadece preterm AGA bebeklerin SNAPPE-II değerleri ile aralarında anlamlı bir pozitif korelasyon bulundu ( $p<0,001$ ).
- 10-Preterm AGA , preterm SGA grupları arasında doğum ağırlığı ile SNAPPE-II arasında anlamlı bir negatif korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ).

**11-**SNAPPE-II ile 1ve 5. dakika Apgar skorları arasında anlamlı bir negatif korelasyon olduğu saptandı ( $p<0,001$ ).

**12-**SNAPPE-II değeri  $\leq 28$  olan hastalar düşük riskli, SNAPPE-II değeri  $>28$  olanlar ise yüksek riskli hastalar olarak belirlendi.

**13-** M30 ile gösterilen plasental apoptozis yüzdesinin ortalaması yüksek riskli hasta grubunda 21.3 iken, düşük riskli hasta grubunda 17 olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0,001$ ).

**14-** Düşük riskli hastaların %2,3'ü entübe edilirken , yüksek riskli hastaların %100'ü entübe edildi ( $p<0,001$ ). Düşük riskli hastaların %2,3'ünde sepsis gözlenirken yüksek riskli hastaların %66,7'inde sepsis gözlendi ( $p<0,001$ ). Sepsis gözlenme oranı düşük riske göre, yüksek riskli hastalarda 84 kat daha fazla saptandı(  $P<0,001$ ).

**15-** Yüksek riskli hastalarda ölüm oranı %26,7 iken, düşük riskli hastaların hiçbirinde ölüm gözlenmedi ( $p<0,05$ ). Düşük riskli hastalarda intrakranial kanama %2,3 iken, yüksek riskli hastalarda %20 olarak saptandı ( $p<0,05$ ). Yüksek riskli hastalarda intrakranial kanama riski düşük riskli gruptaki hastalara göre 10,5 kat daha fazla idi. Pnömotoraks sadece yüksek riskli hastalarda %13,3 iken, düşük riskli hastalarda hiç gözlenmedi.

**16-** Kızların % 87,5'i düşük riskli grupta iken % 12,5'i yüksek riskli grupta yer alıyordu. Erkeklerin ise % 64.7'si düşük riskli grupta iken % 35.3'ü yüksek riskli grupta yer alıyordu ( $p<0,05$ ). Erkek hastaların yüksek riskli grupta olma olasılıkları 3,8 kat daha fazla olarak saptandı ( $p<0,05$ ).

**17-**Düşük risk grubundaki hastaların mekanik ventilasyon, CPAP, yatış süreleri, yüksek risk grubundaki hastalara göre anlamlı derecede düşüktü (sırası ile  $p:0,000$ ,  $p:0,005$ ,  $p:0,003$ ).

## KAYNAKLAR

1. WHO:Child Health Research Project Special Report: Reducing perinatal and neonatal mortality, October 1999.
2. Türk Neonatoloji Derneği Çok Merkezli Çalışma Grubu: Türkiye'de Perinatal Mortalite:1999. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2000;43:315.
3. Smith S, Baker P, Symonds M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1997; 177; 57-65.
4. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, Ed. Fundamental Immunology. Lippincott-Raaven Publishers. 1999.
5. Kerr JFR, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26; 239-57.
6. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In:McGee JO'D, Issacson PG, Wright N, Eds. Oxford Textbook of Pathology, Vol 1. USA, Oxford University Press 1992: 142-47.
7. Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where Fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. Placenta. 1996;17; 387-91.
8. Yasuda M, Umamura S, Osamura R. Apoptotic cell in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. Arch Histol Cytol. 1995;58:185-90.
9. Smith S, Baker P, Symonds M. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol. 1997; 177; 1395-1400.
10. Difederico E, Genbabacev O, Fisher SJ, Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. Am J Pathol. 1999; 155;293-301.
11. Sjöström J, Bergh J. How apoptosis regulated, and what goes wrong in cancer? BMJ 2001;322:1536-38.
12. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Kopman WJ Ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins 2001.
13. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. Mol Pathol 2000;53:55-63.

14. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cell Injury and Cell Death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: WB Saunders Company.1999:18-25.
15. Carlson BM. Human Embryology & Developmental Biology. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Mosby Inc 1999: 148, 190,222.
16. Lodish H, Berk A, Ziporsky SL et al. The Dynamic Cell. In: Molecular Cell Biology. 4<sup>th</sup> ed. New York, WH Freeman & Co. 2000.
17. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. J Urol 2002; 167:267-71.
18. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 1995;267: 1456-62.
19. Jersak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immun privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 100:138-42
20. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science 1995;267:1449-55.
21. Stassi G, Todara M, DeMaria R. Defective expression of CD95(Fas/Apo-1)molecule suggests apoptosis impairment of T and B cells in HLA-B8. DR3-positive individuals. Human Immunology 1997;55:39-45.
22. Alderson M, Armitage R, Maraskovsky E. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. J Exp Med. 1993;178:2231-5.
23. Ortiz A, Danoff T, Kalluri R. Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. Am J Physiol 1996;241:1193-1201.
24. Yang E, Korsmeyer j. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. Blood 1996;88:386-401.
25. Reed J C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. The Journal of Cell Biology 1994;124:1-6.
26. Reed J C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature 1997;387:773-6.
27. Rodenburg RJ, Raats JMH, Pruijijn GJM, van Venrooijji WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? Bioessays 2000;22:627-36.
28. Gobe G, Zhang XJ, Cuttle L et al. Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischemic acute renal failure. Immunol Cell Biol 1999;77:279-86.

- 29.** Sheikh MS, Fornace AJ Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000;182:171-81.
- 30.** Kadyrov M, Kaufmann P, Huppertz B. Expression of cytokeratin 18 neo-epitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. *Placenta* 2001;22:44-8.
- 31.** Caulin C, Salvesen G, Oshima R. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filament during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997;38:1379-94.
- 32.** Ku N, Liao J, Omary M. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 1997;272:33197-203.
- 33.** Bu S, Yin L and Ren H. Et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 1997;79:1944-50.
- 34.** Sakagami H, Kusama K, Toguchi M Kochi M. Induction of non-apoptotic cell death by sodium 5, 6-bezylidene-L-ascorbate in human salivary gland tumor cell line. *Anticancer Res* 1999;19:4045-8
- 35.** Carr NJ. M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1768-72.
- 36.** Morsi HM, Leers M and Radespiel M. Et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2000;77:11-7.
- 37.** Morsi HM, Leers M. And Jager W. Et al. The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neoepitope, the bcl-2 protooncogene, and the Ki67 proliferation marker in normal, hyperplastic and malignant endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:118-26.
- 38.** Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Saaon S. Identification of a programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;19:493-501.
- 39.** Huppertz B, Frank H, Reister F. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998;110:495-508.

- 40.** Axt R, Kordina A, Meyberg R. Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1999;26:195-8.
- 41.** Labat-Moleur F, Guillerment C and Lorimier et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvent. *J Histochem Cytochem* 1998;46:327-34.
- 42.** Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21:1465-8.
- 43.** Huppertz B and Hunt JS. Trophoblast apoptosis and placental development. *Placenta* 2000;21:74-6.
- 44.** Huppertz B, Frank H, Reister F. The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999;200:1-18.
- 45.** Robertson JD, Orrenius S, and Zhivotovsky B. Review: Nuclear evnets in apoptosis. *J Struct Biol* 2000;129:346-58.
- 46.** Huppertz B, Frank H, Reister F. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragment in vitro. *Lab Invest* 1999;79:1687-1702.
- 47.** Danihel L, Gomolcal P, Korbel M. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta histochem* 2002;104:335-8.
- 48.** Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:57-65.
- 49.** Kokawa K, Shikone T and Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1998;4:87-91.
- 50.** Kokawa K, Shikone T and Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embriyonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 1998;19:21-6.
- 51.** Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1395-1401.

- 52.** Alexander D.A, Kelly A.B, Steven R.W, et al. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;96:271-6.
- 53.** Akin A, Perinatal Problems In Turkey. In: *Recent Progress in Perinatal Medicine*. Ed.1, Gati. Postgraduate Medical University Budapest. Pp 1987;78-83.
- 54.** Richardson DK, Corcoran JD, Escobar JG, Lee KS. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *Pediatrics* 2001;138:92-100.
- 55.** Sağol S., Sağol Ö., Ozkal S., Uçar S. Role of Apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod M* 2002;47:809-815
- 56.** Bernstein P, Divon M. Etiologies of fetal growth restriction. *Clin Obs and Gyn.* 1997;40:723-9.
- 57.** Kakinuma C, Kuwayama C, Kaga N. Trophoblastic apoptozis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor. *Obstet Gynecol* 1997;90:117-24.
- 58.** Kingdom JCP, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997;18:613-21.
- 59.** DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 1999;155:293-301.
- 60.** Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24:2002-9.
- 61.** Graeber TG, Osmanian C, Jacks T. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 1996;379:88-91.
- 62.** Sayill J. Review: Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994;24:715-23.
- 63.** Mayhew TM, Leach L, McGree R. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trofoblast at 13-41 weeks of gestation. *Placenta* 1999;20:407-22.
- 64.** Kim CJ, Choe Y, Yoon B, Kim W. Patterns of bcl-2 expression in the placenta. *Pathol Res Pract.* 1995;191:1239-44.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AGA</b>	Appropriate For Gestational Age (Gebelik Yaşına Göre Uygun)
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome;(Edinsel İmmün Yetersizlik Sendromu)
<b>APAF-1</b>	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör- 1
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma / leukemia-2 (B hücreli Lenfoma, Lösemi-2)
<b>Caspase</b>	Cysteine-containing <b>aspartate specific protease</b>
<b>CK 18</b>	Cytokeratin 18; (Sitokeratin 18)
<b>CPAP</b>	Continuous Positive Airway Pressure (Hava yoluna devamlı pozitif basınç uygulanması)
<b>DISC</b>	Death Inducing Signal Complex (ölümü başlatan sinyal kompleksi)
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>İUGG</b>	İntra Uterin Gelişme Geriliği
<b>FADD</b>	Fas Associated Death Domain (Fas ölüm bölgesi bulunan adaptör protein)
<b>MoAb</b>	Monoklonal antikor
<b>NGF</b>	Nerve Growth Faktör(Sinir büyüme faktörü)
<b>SNAPPE-II</b>	Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, Version II (Perinatal uzantılı Akut Neonatal Fizyolojik Skoru -II)
<b>SGA</b>	Small for gestastational age (Gebelik yaşına göre küçük)
<b>TRADD</b>	TNFR-1 Associated Death Domain(Tümör Nekrozis Reseptör 1 Ölüm Bölgesi Olan Adaptör Protein)
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling



## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Apoptotik Hücre Zarı Üzerindeki Küçük Kabarcıklar).....	16
Şekil 2 (Apoptozis ve Nekrozun Morfolojik Görünümleri).....	16
Şekil 3 (Apoptozis Oluşum Mekanizmasında Rol Alan Faktörler).....	19
Şekil 4 (Apoptozisde Mitokondrinin Rolü).....	20
Şekil 5 (Gruplara Göre Klinik Değişkenler).....	32
Şekil 6 (Gruplara Göre Sürekli Klinik Değişkenler).....	33
Şekil 7 (M30 ile Boyanan Plasental Apoptotik Hücreler).....	34
Şekil 8 (Gruplara Göre Plasental Apoptozis Göstergeleri).....	35
Şekil 9 (Apoptozis Göstergeleri İle Preterm Hastalarda Sepsis Gelişimi Arasındaki İlişki).....	36
Şekil 10 (Entübe Edilmeye Göre Eşik Değer İçin Kullanılan ROC Eğrisi).....	39
Şekil 11 (Düşük ve Yüksek Riskli Gruplarda Klinik Değişkenlerin Oranları) .....	41
Şekil 12 (Düşük ve Yüksek Risk Hasta Gruplarına Göre Klinik Değişkenler).....	42

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1 (İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar).....</b>	<b>12</b>
<b>Tablo 2 (Apoptozisin İnhibisyonu ve Artışı İle Seyreden Hastalıklar)..</b>	<b>13</b>
<b>Tablo 3 (Nekrozis ve Apoptozisin Karşılaştırılması).....</b>	<b>15</b>
<b>Tablo 4 (Bcl-2 Ailesi).....</b>	<b>21</b>
<b>Tablo 5 (SNAPPE-II Parametreleri).....</b>	<b>26</b>
<b>Tablo 6 (Gruplara Göre Klinik Değişkenler).....</b>	<b>32</b>
<b>Tablo 7 (Gruplara Göre Sürekli Klinik Değişkenler).....</b>	<b>33</b>
<b>Tablo 8 (Grupların Göre Ortalama Plasental Apoptozis Göstergeler).35</b>	
<b>Tablo 9 (Apoptozis Göstergeleri İle Preterm Hastalarda Sepsis Gelişimi Arasındaki İlişki).....</b>	<b>36</b>
<b>Tablo 10 ( SNAPPE-II ile Klinik Değişkenler Arasındaki İlişki).....</b>	<b>38</b>
<b>Tablo 11 (Düşük ve Yüksek Riskli Gruplarda Klinik Değişkenler ve Risk Katsayıları).....</b>	<b>40</b>
<b>Tablo 12 (Düşük ve Yüksek Riskli Hasta Gruplarına Göre Sürekli Klinik Değişkenler).....</b>	<b>42</b>