



**T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI**

**İNTRAUTERİN İNFLAMASYON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
GEBE RATLARDA ETANERSEPT VE MELATONİNİN FETÜS
BEYNİNDEKİ PROİNFLAMATUAR SİTOKİN DÜZEYLERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. MUSTAFA BERBER
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL-2011



**T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI**

**İNTRAUTERİN İNFLAMASYON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
GEBE RATLARDA ETANERSEPT VE MELATONİNİN FETÜS
BEYNİNDEKİ PROİNFLAMATUAR SİTOKİN DÜZEYLERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. MUSTAFA BERBER
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. FİLİZ BAKAR

İSTANBUL-2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
Summary.....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	iv
Şekiller.....	v
Tablolar.....	vi
1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	5
2.1. İntrauterin inflamasyon	5
2.1.a. İntrauterin inflamasyonun tanımı.....	5
2.1.b. Perinatal beyin hasarı ve intrauterin inflamasyonun tarihçesi.....	6
2.1.c. İntrauterin inflamasyonun etyolojisi.....	8
2.1.d. İntrauterin inflamasyonun patofizyolojisi.....	10
2.1.e. Epidemiyoloji.....	12
2.2. Sitokinler.....	13
2.2.a. Tümör nekroz faktör-alfa.....	14
2.2.b. İnterlökin-1.....	15
2.2.c. İnterlökin-6.....	16
2.2.d. İnterferon-gama.....	16
2.3. İntrauterin inflamasyonun fetüs üzerine etkileri.....	18
2.3.a. Prematür membran rüptürü ve preterm doğum.....	18
2.3.b. Merkezi sinir sistemine etkileri.....	20
2.3.b.1. Beyin hasarının patofizyolojisi.....	24
2.3.b.2. Glial aktivasyon.....	27
2.3.b.3. Nöroinflamasyonun iki yüzü.....	30
2.3.c. Akciğerler.....	31
2.3.d. Diğer organlar.....	33
2.4. Hayvan deneyleri.....	33
2.4.a. İntraserebral lipopolisakkarit uygulanması.....	34
2.4.b. Fetüse intravenöz lipopolisakkarit uygulanması.....	35
2.4.c. İntrauterin lipopolisakkarit uygulanması.....	35
2.4.d. Maternal lipopolisakkarit uygulaması.....	36

2.4.e. Antiinflamatuvar tedavi.....	37
2.4.e.1. Melatonin.....	37
2.4.e.2. Etanersept (TNF- α reseptör antagonisti).....	39
3. Gereç ve Yöntem.....	40
3.1. Deney hayvanları ve deney protokolü.....	40
3.2. Deney prosedürleri ve gruplar.....	41
3.2.a. Cerrahi prosedürler.....	41
3.2.b. İlaçların uygulanması.....	44
3.2.c. Çalışma grupları ve ilaç uygulama protokolü.....	44
3.2.d. Doku hazırlığı ve sitokin analizi.....	45
3.2.e. İstatistiksel analiz.....	46
4. Bulgular ve Sonuçlar.....	47
4.1. Sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi.....	47
4.1.a. Tümör nekroz faktör-alfa.....	47
4.1.b. İnterlökin-1beta.....	49
4.1.c. İnterlökin-6.....	50
4.1.d. İnterferon-gama.....	52
5. Tartışma.....	54
6. Sonuç.....	62
7. Kaynaklar.....	63

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim, çalışmalarımın yürütülmesi ve tezimin yazımında destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Filiz Bakar'a; eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen başta Prof.Dr. Ayça Vitrinel ve Prof..Dr. M. Reha Cengizlier olmak üzere Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine; tezimin planlanması ve uygulanması esnasında yardımını ve desteğini hep hissettiğim Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. C. Narter Yeşildağlar'a,

Tezimin laboratuvar çalışmalarını uygulayan ve desteklerini esirgemeyen başta Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Serdar Öztezcan olmak üzere, emeği geçen tüm biyokimya çalışanlarına,

Tezimin çalışmaları esnasında hayvanlarla ilgili her konuda yardımcı olan YUDETAM'dan Vet. Hk. Burcu Çevreli'ye ve laboratuvar işlemleri sırasında yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalından Dr. Burcu Şeker ve Dr. Siğnem Eyüboğlu'na,

Eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren eşim, ailem ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Mustafa BERBER

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Yenidoğan Bilim Dalı

Yandal Uzmanlık Öğrencisi

İstanbul,2011

ÖZET

Amaç: İntrauterin inflamasyon, ak madde hasarı ve serebral palsi için önemli risk faktörlerindedir. Proinflamatuvar sitokinler inflamasyonun beyin dokusuna iletilmesi ve beyin hasarı gelişimi açısından önemlidir. Bu çalışmada antiinflamatuvar etkileri olduğu gösterilen etanersept ve melatoninin intrauterin inflamasyon modelinde fetüs beynindeki proinflamatuvar sitokin düzeylerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda gebeliğin 15. gününde intrauterin (İU) olarak verilen lipopolisakkarit (LPS) ile intrauterin inflamasyon modeli oluşturuldu. Uygulanacak tedaviye göre sıçanlar 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 15. gün İU olarak steril SF pozitif kontrole ise LPS uygulandı. Diğer 3 gruba 15. Gün İU olarak LPS uygulandıktan sonra melatonin grubuna sonraki 5 gün boyunca günde tek doz melatonin verildi. Etanersept grubuna 2 gün arayla 2 doz olacak şekilde etanersept uygulandı. Melatonin+etanersept grubuna ise her iki ilaç birlikte uygulandı. Melatonin ve etanerseptin tumor nekroz factor-alfa (TNF- α), interlökin-1beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve interferon-gama (IFN- γ) düzeylerine etkisini araştırmak amacı ile LPS uygulamasından 5 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek fetüs beyin dokuları alındı. TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IFN- γ düzeyleri doku homojenatında çalışıldı.

Bulgular: Melatonin grubunda TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ düzeyleri pozitif kontrole göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p < 0.01$). Etanersept grubunda, TNF- α dışındaki sitokin düzeyleri pozitif kontrole göre azalmıştı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Melatonin+etanersept grubunda ise TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ düzeyleri melatonin ve etanersept gruplarına göre yüksek bulundu.

Sonuç: İU inflamasyon modelinde melatonin ve etanerseptin proinflamatuvar sitokin düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada melatoninin, TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ düzeylerini pozitif kontrole göre belirgin derecede azalttığı ve proinflamatuvar sitokin düzeylerini azaltıcı etkisinin etanerseptte göre daha iyi olduğu gösterildi.

Anahtar kelimeler: İntrauterin inflamasyon, sitokin, melatonin, etanersept, LPS

SUMMARY

Aim: Proinflammatory cytokines are important mediators for transmitting and initiating the inflammation in the brain tissue. We aimed to investigate the effects of melatonin and etanercept on fetal brain proinflammatory cytokine levels in an intrauterine inflammation model.

Method: Timed-pregnant Sprague-Dawley rats subjected to intrauterine injection of lipopolysaccharide (LPS) to induce a model of intrauterine inflammation on day 15 of gestation. Rats were divided into 5 groups according to the applicable treatment. Control and LPS groups were injected by saline and LPS, respectively. After LPS injection, melatonin was administered in consecutive 5 days in the melatonin group and etanercept was applied in a total of 2 doses, 2 days apart in the etanercept group. Melatonin and etanercept treatment were combined for melatonin+etanercept group. Rats were sacrificed on day 20 of gestation and samples of fetal brain tissues were obtained. Levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interferon- γ (IFN- γ) were measured in homogenates of fetal brain.

Results: After 5 days of LPS injection, cytokine levels except TNF- α were still high in LPS group. In the melatonin group, TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ levels were significantly lower than the LPS group ($p < 0.01$). The cytokine levels except TNF- α were also decreased in the etanercept group but the findings were not statistically significant. By contrast, the combined treatment with etanercept and melatonin had an antagonist effect on TNF- α , IL-1 β and IFN- γ levels and these cytokines were higher than either melatonin or etanercept alone.

Conclusion: We have demonstrated that both melatonin and etanercept have decreasing effects on can decrease the cytokine levels in the brain tissue in an intrauterine inflammation model stimulated by LPS. Results from this study suggested that melatonin has a better antiinflammatory activity on proinflammatory cytokines and may reduce neuronal damage more effective than etanercept.

Keywords: Intrauterine inflammation, cytokine, melatonin, etanercept, LPS

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BDNF	Brain-derived nörotrofik faktör
BPD	Bronkopulmoner displazi
CRP	C-reaktif protein
FİCS	Fetal inflamatuvar cevap sendromu
GDNF	Glial cell line-derived nörotrofik faktör
ICAM-1	Intercellular adesion molecule-1 (Hücreler arası adezyon molekülü-1)
IFN- γ	İnterferon-gama
IL-1	İnterlökin-1
IL-1 α	İnterlökin-1alfa
IL-1 β	İnterlökin-1beta
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IL-17	İnterlökin-17
IL-18	İnterlökin-18
İNOS	Uyarılabilir nitric oksit sentaz
İP	İntraperitoneal
İUE	İntrauterin enfeksiyonlar
İÜİ	İntrauterin inflamasyon
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
NGF	Nöronal büyüme faktörü
NO	Nitrik oksit
NK hücre	Doğal öldürücü hücre
LPS	Lipopolisakkarit
mRNA	Messenger RNA
PGE2	Prostaglandin E2
PROM	Prematür membran rüptürü
PVL	Periventriküler lökomalazi
ROP	Premature retinopatisi
TLR	Toll-like reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa

ŞEKİLLER

	Sayfa no
Şekil 1	İntrauterin enfeksiyonların bulaşma yolları..... 9
Şekil 2	Koryoamniyonitin patofizyolojisi. Maternal/fetal yanıt ve komplikasyonlar..... 11
Şekil 3	TNF- α 'nın etkileri..... 15
Şekil 4	IFN- γ 'nın etkileri..... 17
Şekil 5	İntrauterin inflamasyonun komplikasyonları 19
Şekil 6	İntrauterin enfeksiyon ve beyin hasarı arasındaki ilişki..... 21
Şekil 7	Periventriküler lökomalazi..... 23
Şekil 8	İnflamasyon ve sık görülen diğer sebeplere bağlı olarak oluşan beyin hasarının patofizyolojisi..... 26
Şekil 9	TLR reseptörünün sinyal ileti yolu..... 28
Şekil 10	Yenidoğanda perinatal beyin hasarına yol açan nörotoksik ve nörotrofik etkilerin moleküler yolları. 29
Şekil 11	BPD gelişimine yol açan patolojik olaylar..... 32
Şekil 12	LPS enjeksiyonunun temsili şekli..... 41
Şekil 13	Çalışmanın şematik olarak özeti..... 46
Şekil 14	Grupların TNF- α ortanca değerleri ve istatistik sonuçları.... 48
Şekil 15	Grupların IL-1 β ortanca değerleri ve istatistik sonuçları..... 50
Şekil 16	Grupların IL-6 ortanca değerleri ve istatistik sonuçları..... 51
Şekil 17	Grupların IFN- γ ortanca değerleri ve istatistik sonuçları..... 53

TABLULAR

	Sayfa no
Tablo 1 Koryoamniyonit riskini artıran bazı faktörlerin rölatif riskleri..	13
Tablo 2 Gebe sıçanların ortalama ağırlıkları.....	47
Tablo 3 Grupların ortalama TNF- α düzeyleri.....	48
Tablo 4 Grupların ortalama IL-1 β düzeyleri.....	49
Tablo 5 Grupların ortalama IL-6 düzeyleri.....	51
Tablo 6 Grupların ortalama IFN- γ düzeyleri.....	52

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Intrauterin enfeksiyonlar (İUE), tıptaki tüm gelişmelere rağmen halen tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Antenatal dönemde gelişen enfeksiyonlar erken dönemde fetüsün kaybı, organ gelişiminde anormalliklere ve preterm doğumlara yol açabilirken uzun dönemde ise değişik sistemlerde oluşturduğu hasara göre mental retardasyon, serebral palsy, prematüre retinopatisi, tiroid hormon eksikliği ve bronkopulmoner displazi gibi ciddi problemlere yol açabilmektedir (1).

Intrauterin enfeksiyonların en sık yol açtığı klinik tablo koryoamniyonittir. Koryoamniyonit, amniyokoryonik zarlarda enfeksiyon veya diğer patolojik olaylara bağlı olarak inflamasyon gelişmesi olarak tanımlanmaktadır. Koryoamniyonit, A.B.D.'deki tüm doğumların %1-4'ünde tespit edilmektedir (2,3). Koryoamniyonitte, genellikle bakteriler izole edilemese de uterin boşluğa asendan yol ile bakterilerin invazyonu en önemli bulaşma yolu olarak kabul edilmektedir (4,5). Koryoamniyonit ile en sık ilişkili olan mikroorganizmalar *Ureaplasma spp.* ve *Mycoplasma spp.* gibi düşük virülansa sahip bakterilerdir (2,3,6,7). Ayrıca sıklıkla aneroplara, gram(+) ve gram(-) aerob bakteriler etiyolojide yer almaktadır (8).

Intraamniyotik enfeksiyonlar, immünoisitleri uterin boşluğa çeken bir dizi inflamatuvar olayı başlatan en önemli etkidir. Koryoamniyonitlerde inflamasyon süreci genellikle uzun süreli olduğu için inflamatuvar hücreler nötrofillerle sınırlı değildir (4,9). İnflamasyonun başlaması ve devamında proinflamatuvar sitokinler (Tümör nekroz factor-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ)) önemli görevler üstlenir (10). Enfeksiyonun devam etmesi sonucunda, proinflamatuvar ve inhibitör sitokinlerin karışımından oluşan maternal ve fetal inflamatuvar cevap ortaya çıkar. İntraamniyotik enfeksiyon, fetüste doğrudan enfeksiyona veya sepsise yol açabileceği gibi enfeksiyon olmadan sitokinler aracılığı ile beyinde ak madde hasarı veya diğer organ gelişimlerinde anormalliklere de yol açabilir.

Koryoamniyonitte, fetal inflamasyon bulgularının olması (funizit, artmış kord kanı IL-6 seviyesi), inflamasyonun fetüsü etkilediğini gösteren bir

belirteçtir (11). Fetüs inflamasyona ya direkt amniyon sıvısı ile ya da fetal-plasental dolaşım ile maruz kalır. Koryoamniyonit ve ortaya çıkan inflamasyona, ilerleyen süreçte fetüsün verdiği tepki fetal inflamatuvar cevap sendromu (FİCS) olarak isimlendirilir (11). FİCS'in, periventriküler lökomalazi, serebral palsi, fetal sepsis, fetal kardiyak disfonksiyon, hipotiroidi, prematüre retinopatisi ve bronkopulmoner displazi gibi fetal-neonatal morbiditelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (12).

Prematür membran rüptürü (PROM), doğum eylemi başlamadan membranların yırtılması olarak tanımlanmaktadır. Preterm doğumların yaklaşık 1/3'ünde PROM ve PROM'lu annelerin %13-60'ında klinik olarak belirgin intraamniyotik enfeksiyon bulguları mevcuttur. Preterm doğum halen tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. Batı ülkelerinde preterm doğum oranı tüm canlı doğumların %5-13'ünü oluşturur (13). Çocuklardaki uzun dönem nörolojik hasarların yarısından preterm doğumlar sorumludur (14). Preterm doğum, hem akut hem de kronik intrauterin enfeksiyon ve inflamasyonla ilişkilidir. Bakteriyel vajinoz, asemptomatik bile olsa preterm doğumun güçlü bir prediktörüdür (15). Otuz haftanın altında doğan bebeklerde, amniyon sıvısında proinflamatuvar sitokin düzeyi daha yüksek saptanmıştır (16).

Beyin, antenatal ve perinatal dönemde inflamatuvar aracılıklı olaylar için önemli bir hedeftir. Klinik ve hayvan çalışmaları sayesinde günümüzde fetal inflamasyon ve beyin hasarı veya anormal beyin gelişimi arasında ilişki olduğu konusunda şüphe kalmamıştır (17-21). Antenatal inflamasyonun - özellikle koryoamniyonit ve funizit- preterm doğum, ak madde hasarı ve serebral palsi için en önemli risk faktörlerinden olduğu gösterilmiştir (22,23). Bunun yanında antenatal inflamasyonun neden olduğu preterm doğum beyin hasarı riskini artıran önemli bir faktördür. Otuziki haftanın altında doğan prematüre bebeklerde en sık görülen beyin hasarı yaygın veya fokal ak madde hasarı veya periventriküler lökomalazidir (PVL) (24). Klinik çalışmalar, antenatal dönemde inflamasyona maruz kalan bebeklerde periventriküler lökomalazi ve serebral palsi gelişme riskinin belirgin derecede arttığını göstermiştir (25-27). İntrauterin inflamasyona bağlı beyin hasarının

oluşumuna dair patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak son bulgular annedeki veya fetüsteki immün cevaptan daha çok fetüs beynindeki lokal inflamasyonun etkili olduğunu göstermektedir. Hayvan deneylerinde, anneye lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu sonrasında fetüs beyninde artmış proinflamatuvar sitokin mRNA düzeylerinin tespit edilmesi, bu sitokinlerin beyin dokusu içinde üretildiğini, lokal inflamasyonun sistemik inflamasyonun devamı şeklinde ortaya çıktığını ve inflamasyona bağlı beyin hasarı gelişiminde asıl önemli faktör olduğunu göstermiştir (28-30). Deneysel çalışmalar, inflamasyona bağlı aşırı üretilen sitokinlerin oligodendrosit ve onların öncülleri üzerine toksik etkileri olduğunu göstermiştir (31). Ayrıca intrauterin inflamasyon, astrositlerin uyarılmasına ve myelin ile ilişkili genlerin down-regülasyonuna neden olmaktadır (32,33). İntrauterin inflamasyonun araştırıldığı hayvan deneylerinde, inflamasyonun ak maddede mikroglia aktivasyonuna, astrositlerin zarar görmesine ve oligodendrositlerin azalmasına yol açtığı, beyin yapısında ise subkortikal ak madde, striatum, hipokampus gibi subkortikal bölgelerde nöronal hasara yol açtığı gösterilmiştir (34).

Antenatal bakımdaki tüm gelişmelere rağmen intrauterin inflamasyonu veya oluşabilecek beyin hasarını engellemeye yönelik bir tedavi bulunmamaktadır. Ancak deneysel çalışmalar bazı antiinflamatuvar ve antioksidan moleküllerin hasar oluşumunu azaltabileceğini veya inflamasyonu baskılayabileceğini göstermiştir. Antioksidan, antiinflamatuvar ve antioksidantoksik özelliklerinin yanında, yenidoğan bebeklerde dahi güvenle kullanılabilir potansiyele sahip olan melatonin, gelecekte intrauterin inflamasyon tedavisinde kullanılabilir ilaçlardır. Farklı hipoksik-iskemik, eksitotoksik ve inflamasyon modellerinde hasarı azalttığı ve anti inflamatuvar etkisinin olduğu gösterilmiştir (35-40).

TNF- α reseptör antagonisti olan etanersept, erişkinlerde otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Değişik hayvan çalışmalarında etanerseptin antiinflamatuvar etkinliği ve beyin dokusunda inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (41-43). Ancak intrauterin inflamasyonda etkinliğine ve sitokin düzeylerine etkisine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu alışmada LPS ile intrauterin inflamasyon modeli oluşturulmuş gebe sıçanlarda melatoninin ve etanerseptin, fetüs beyin dokusunda ortaya çıkan lokal inflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine olan etkisini ve beyin dokusunda antiinflamatuvar etkilerinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İntrauterin inflamasyon

2.1.a. İntrauterin inflamasyonun tanımı

İntrauterin inflamasyon (İÜİ), fetüsün akut veya kronik değişik etkenlere bağlı olarak, dolaylı veya doğrudan inflamatuvar etkilere maruz kalması olarak tanımlanabilir (44). İnflamasyon, anneden, fetüsten veya her ikisinden kaynaklanabilir. Enfeksiyonlar, inflamasyona yol açan en önemli etkenlerdir. Enfeksiyonun veya inflamasyonun olduğu bölgeye göre değişik klinik tablolar tanımlanmıştır. Amniyonit, amniyon sıvısının; koryoamniyonit, fetal zarların (koryon ve amniyon); funizit, umbilikal kordun; villit ise plasentanın enfeksiyonu veya inflamasyonunu tanımlamak için kullanılmaktadır. İÜİ'ye yol açan en önemli klinik tablo koryoamniyonittir. Koryoamniyonit, plasentada amniyokoryonik zarların enfeksiyon veya diğer patolojik olaylara bağlı olarak inflamasyon gelişmesi olarak tanımlanmaktadır. Özellikle PROM ve spontan preterm doğumlarda koryoamniyonit sıklığı belirgin derecede artmıştır (45-47). Koryoamniyonite yol açan en önemli etken enfeksiyonlardır. Ancak fetal hipoksi, mekonyum ve amniyotik sıvının pH'sındaki değişiklikler gibi etkenler de koryoamniyonite sebep olabilirler (48). Koryoamniyonit, ayrıca etiyolojiden bağımsız olarak anne ile bebek arasındaki zarların yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonlarını etkileyerek fetüsü diğer etkenlere açık hale getirir (44).

Koryoamniyonit, klasik olarak histolojik ve klinik olarak iki şekilde sınıflandırılır. Histolojik koryoamniyonit, membranlarda inflamasyon bulgularının (lökosit infiltrasyonu) olmasıdır (49-52). Klinik koryoamniyonit ise lokal ve sistemik inflamasyon belirtilerinin (ateş>37.5°C, uterus hassasiyeti, karın ağrısı, kötü kokulu vajinal akıntı, anne ve bebekte taşikardi, toplam lökosit sayısı>15000) olması olarak tanımlanmıştır (53-56). Son zamanlarda klinik koryoamniyonit tanımı inflamatuvar belirteçlerdeki değişiklikler ile desteklenmeye başlamıştır (57-59).

İÜİ'nin anneden daha çok fetüs üzerine olumsuz etkileri vardır. İnflamasyondan etkilenmiş bebeklerde; preterm doğum, PROM,

bronkopulmoner displazi (BPD), serebral palsy, PVL, sepsis gibi komplikasyonlar görülebilir.

2.1.b. Perinatal beyin hasarı ve intrauterin inflamasyonun tarihçesi

İlk kez 1970'lerde Macvigar, klinik ve histolojik koryoamniyonitin amniyotik boşluğun mikroorganizmalar ile invazyonu veya intraamniyotik enfeksiyonların bir sonucu olduğunu yazmıştır (60). Ancak Macvigar bu sonuca ulaşmadan çok önce, 1930'larda Kobak fetal bakteriyemi ile intraamniyotik enfeksiyon ve plasentit arasındaki ilişkiyi göstermiştir (61). Daha sonra 1950'de Knox PROM'da, rüptür bölgesinin komşuluğunda histolojik olarak inflamasyon ve enfeksiyon bulgularının varlığını göstermiştir (62). Hawkinson, 1966'da preterm doğum ve PROM'un servisit, vajinit gibi alt genital sistem enfeksiyonu olan hamilelerde daha sık olduğunu ve bu enfeksiyonların kontrol altına alınması ile PROM ve preterm doğumların önemli oranda azaldığını göstermiştir (63). 1988'de ise Romero, kommensal vajinal floranın veya asemptomatik ve semptomatik bakteriyel enfeksiyonların membranlar intakt olsa da fetal membranlardan geçip intraamniyotik enfeksiyona yol açabileceğini belirtmiştir (64,65).

Antenatal ve perinatal problemlere bağlı beyin hasarı geliştiği 1900'lerden önceki dönemlerde de bilinmekteydi. Konjenital ensefalomyelit terimi, ilk kez Virchow tarafından 1876 yılında yenidoğan bebeklerde postmortem tespit edilen periventriküler ak maddedeki soluk ve yumuşak dejenerasyon alanlarını tanımlamak için kullanılmıştır (66). Mikroskopik olarak bu alanlar, artmış glial hiperplaziye eşlik eden köpüksü makrofajlar içermekteydi ve doku nekrozunu gösteren belirtiler vardı. Virchow, bu hastalığın, annesi çiçek veya sifiliz gibi akut enfeksiyon geçiren bebeklerle ilişkili olduğunu düşünmüştür. Ancak daha sonra tüm vakaların annedeki hastalıklarla ilişkili olmadığını tespit etmiştir. Ayrıca Virchow, çocukluktaki mental retardasyon ve diplejilerin önemli bir kısmında bu patolojilerin sorumlu olduğunu düşünmüştür. Virchow'dan önce Little, spazmodik ekstremitte kontraktürleri, dipleji ve mental retardasyonun belirgin olduğu ve epilepsinin sıklıkla eşlik ettiği bir durum tanımlamış ve bu hastalığın prematürite ve doğum asfiksisi ile ilişkisi olduğunu ileri sürmüştür. 1861'deki makalesinde,

perinatal dönemde gelişen “asphyxia neonatorum” a bağlı sinir hasarının serebral diplejinin sebebi olduğunu söylemiştir (67). Daha sonraki yıllarda Parrot, klinik tanımı hiperaktivite, spastisite, koma, konvülsiyonlar ve solunum problemlerini içerecek şekilde genişletmiştir (68-70). Ayrıca Parrot prematüritenin asıl faktör olduğunu, infarkt ve hemorajinin lezyonlarda en sık görülen özellikler olduğunu tanımlamıştır. 1930'lara gelindiğinde Rydberg, altta yatan sebep olarak etkilenen alanlarda kan akımında azalmaya yol açan hemodinamik sebepleri tanımlamıştır (71).

PVL terimi ilk kez 1962 yılında Banker ve Larroche tarafından postmortem olarak incelenen 117 yenidoğanın 22'sinde tespit ettikleri karakteristik ak madde lezyonlarını tanımlamak için kullanılmıştır. Ayrıca tüm bebeklerin akciğerlerinde patolojik anormallikler tespit etmişler ve önemli bir kısmında da apne periyodu veya resüstasyona ihtiyaç gösteren kardiyak arrest geliştiğini saptamışlardır (72). Klinik olarak apne ve kardiyak arrest ile ilişkili nörolojik anormallikler, mental retardasyon ve ekstremitelerdeki simetrik spastisite olarak tanımlanmıştır. Lezyonlar makroskobik olarak benzer görünümde ve asıl olarak ak maddeyi etkilemekteydi, mikroskobik olarak ise çevresi aşırı derecede vaskülarize likefaksiyon bölgelerinden oluşmakta olduğu gözlenmiştir.

Son 40 yıla kadar enfeksiyon, kan akımında durma, asfiksi gibi direk etkiler suçlanırken, 1976'da Leviton ve Gilles postmortem değerlendirmede kan kültürlerinde bakteri saptanan bebeklerde, steril olanlara göre 34 kat daha fazla oranda histolojik ak madde hasarı olduğunu göstermişler ancak ak madde hasarı olan hiçbir bebeğin beyinde bakteri tespit etmemişlerdir (73). Bu gözlem sonucunda kan dolaşımında bulunan, enfeksiyona yol açmayan inflamasyon ürünlerinin beyin hasarına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar, değişik hayvan çalışmalarında yenidoğan ve fetüslere steril endotoksin enjekte ettiklerinde benzer şekilde ak madde hasarı ve ak madde hacminde azalma tespit etmişlerdir (74-76).

Bu çalışmalarını destekler şekilde 1959-1966 yılları arasında A.B.D.'de yapılan ve 54000 hamilenin katıldığı bir çalışmada, koryoamniyonit ile serebral palsi arasında ilişki tespit edilmiştir. Ayrıca neonatal dönemde ölen

bebeklerin otopsilerinde hamilelikte annede ateşli idrar yolu enfeksiyonu öyküsü olanlarda, ak madde hasarının 400 kat fazla olduğu saptanmıştır (77,78). Son 30 yılda çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel hayvan çalışması benzer şekilde annedeki enfeksiyon veya inflamasyonun direk beyin ile ilişkili olmasa da gelişen fetüs beyni üzerine olumsuz etkileri olduğunu ve inflamatuvar proteinlerin bu hasarın iletilmesinde önemli roller oynadıklarını göstermişlerdir (79-84).

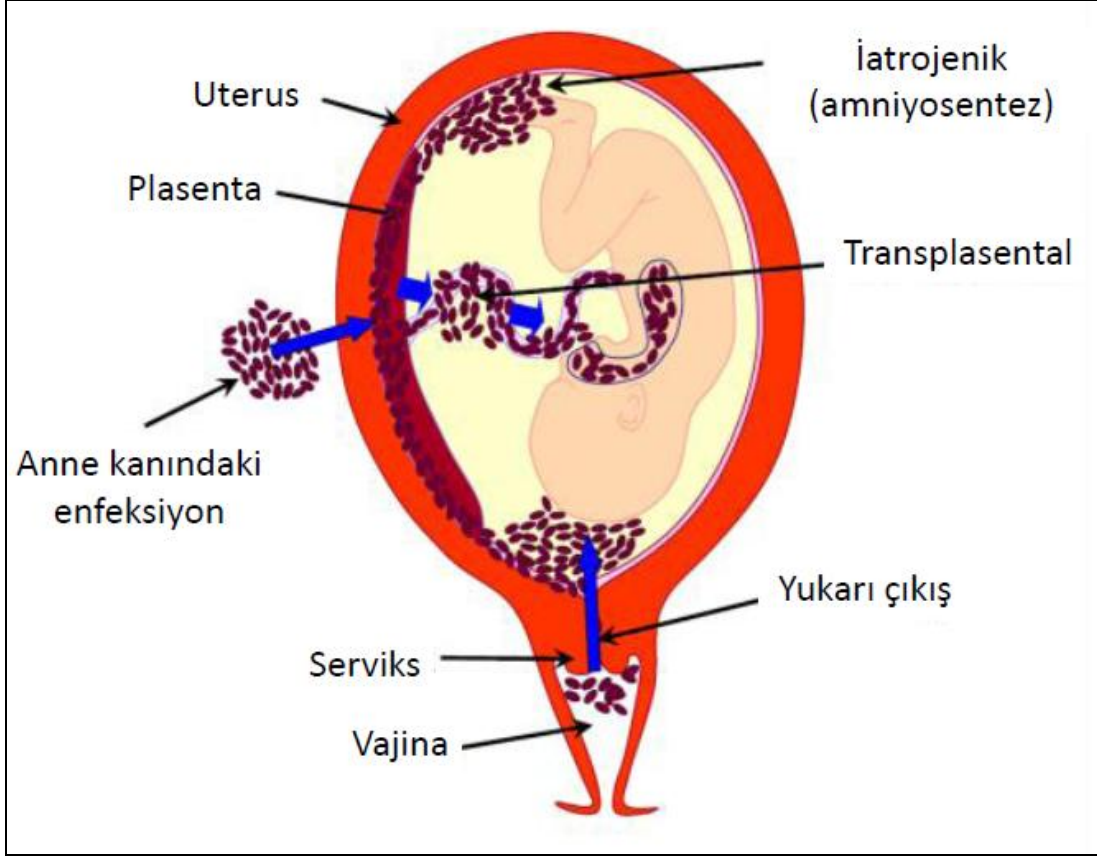
2.1.c. İntrauterin inflamasyonun etiolojisi

İUI'nin en önemli sebebi enfeksiyonlardır. Genellikle bakteriler izole edilemese de uterin boşluğa asendan yol ile bakterilerin invazyonu en önemli bulaşma yolu olarak kabul edilmektedir (4,5). Daha seyrek görülsede hematojen ve iatrojenik olarak doğrudan bulaşma da olabilir (Şekil 1).

Koryoamniyonit zarların bütünlüğü bozulmamış olsa bile oluşabilir (2). Koryoamniyonitlerin çoğunda birden çok sayıda enfeksiyon etkeni sorumludur. Amniyon sıvısı kültürü pozitif olan örneklerin %65'inde iki veya daha fazla enfeksiyon etkeni tespit edilmiştir (3,8). Koryoamniyonit ile en sık ilişkili olan mikroorganizmalar, kadınların yaklaşık %70'nin genital sisteminde bulunabilen *Ureaplasma spp.* ve *Mycoplasma spp.* gibi düşük virülansa sahip bakterilerdir (5-7). *Ureaplasma*, kültür pozitif vakaların %47'sinde, *Mycoplasma* ise %30'unda tespit edilmiştir (8,85). Bu mikroorganizmaların koryoamniyonit ve fetal komplikasyon gelişimi üzerine olan etkileri başlarda tartışmalı olsa da, son dönemlerdeki klinik ve hayvan çalışmaları ile önemli oldukları gösterilmiştir (86). En sık izole edildikleri hasta grubu prematüre doğum veya PROM'lu annelerdir (86). Kadınların çoğunda alt genital sistemde (vajina, serviks) bulunsa da, preterm doğum veya PROM yoksa üst genital sistemde (uterus, fallop tüpleri) bulunma sıklığı %5'in altındadır (86-88). Koryoamniyonitli kadınlarda üretilen diğer mikroorganizmalar; anaeroplara %25-30 (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp*) ve aeroplara %8-15 (grup B streptokok, *E. coli*) olarak sıralanabilir (8). Bu mikroorganizmalar genellikle vajinal veya enterik floranın parçasıdır. Aerobik mikroorganizmaların oluşturduğu vajinitte asendan koryoamniyonit, PROM ve preterm doğum riski

daha fazladır (89). Asendan yola göre daha seyrek olsa da bakteriler hematojen yol ile yayılarak koryoamniyonite sebep olabilir. Özellikle *Listeria monositogenes* hematojen yol ile plasenta ve fetüse bulaşmaktadır (90).

Şekil 1: İntrauterin enfeksiyonların bulaşma yolları (2)



Koryoamniyonit gelişiminde ve ortaya çıkacak problemlerde (preterm doğum, BPD, serebral palsy) etiyolojik ajanın yanında hem annenin hem de fetüsün immün sistemi ve immün düzenleyici genlerindeki polimorfizmler önemlidir (91,92). Sitokinler ile ilgili polimorfizmlerin peri ve prenatal beyin hasarını etkilediğine yönelik gün geçtikçe daha çok delil elde edilmektedir (93). Bu polimorfizmler, proinflamatuvar veya antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını etkileyen genetik farklılıklardır. Örneğin TNF- α geninin promotor bölgesinde (-308) pozisyonundaki polimorfizmin preterm doğum ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Otuziki haftanın altında doğan preterm bebeklerle yapılan bir çalışmada aynı polimorfizme sahip bebeklerde ciddi intraventriküler kanama sıklığının daha yüksek olduğu ve serebral palsy ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (94,95). Serebral palsy ile olan bu ilişkinin

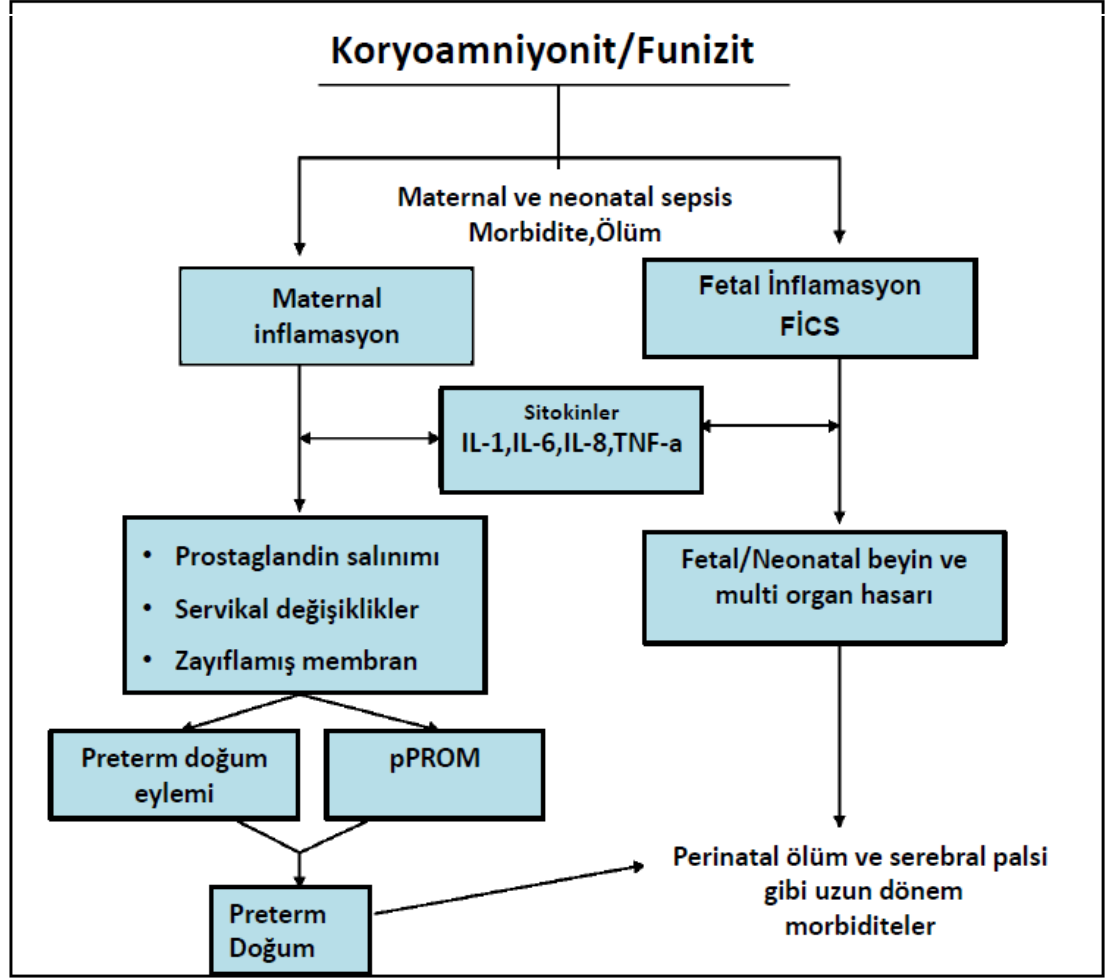
özellikle 32 haftanın altında doğan hemiplejili ve quadriplejili bebeklerde daha belirgin olduğu gözlenmiştir (96). IL-6 geninin promotor bölgesi (-174)'ncü pozisyondaki polimorfizmin yenidoğanlarda monositlerin LPS ile aktifleşmesini kolaylaştırdığı gözlenmiş ve bu polimorfizmi olan 32 haftanın altında doğan prematürelere periventriküler kanama riskinin arttığı ve kraniyal ultrasonografide ak madde hasarının daha fazla olduğu saptanmıştır (97). IL-6 sentezini artıran başka bir polimorfizmde ise kraniyal ultrasonografilerde farklılık yokken, polimorfizmi olan bebeklerin bilişsel gelişimlerinin daha kötü olduğu gözlemlenmiştir (98). Bu olumsuz etkilerin tersine antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'nun sentezini artıran bir polimorfizmin pretermelerde ak madde hasarı riskini belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir (99).

2.1.d. İntrauterin inflamasyonun patofizyolojisi

İntraamniyotik enfeksiyonlar, lökositleri uterin boşluğa çeken bir dizi inflamatuvar olayı başlatan en önemli etkidir. Değişik sınıfta kemokinler ve kemoatraktan proteinler bu olaylarda önemli roller oynarlar ve spesifik görevleri vardır. Örneğin, IL-8 nötrofiller için kemotaktik özellikte iken, IFN- γ , makrofajların aktifleşmesini, T hücre göçünü ve aktifleşmesini uyarmaktadır (10). İnflamasyonun erken döneminde amniyokoryonik zarlarda nötrofil birikimi belirgindir ve ilk savunma hattını oluşturur. İnflamasyona yol açan etken devam ediyorsa T hücreleri, makrofajlar ve dentritik hücrelerin sayısı artmaya başlar. Bu hücreler aynı zamanda inflamasyonun devam etmesi için gereklidir. İnflamasyon, makrofajlar ile birlikte amniyokoryona bitişik olan desiduaya yayılır (100). Koryoamniyonitlerde inflamasyon süreci genellikle uzun süreli olduğu için inflamatuvar hücreler nötrofillerle sınırlı değildir. İnflamasyonun başlaması ve devamında proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ) önemli görevler üstlenir (10). Enfeksiyonun devam etmesi sonucunda proinflamatuvar ve inhibitör sitokinlerin karışımından oluşan maternal ve fetal inflamatuvar cevap ortaya çıkar. İnflamatuvar reaksiyonların şiddetine göre klinik koryoamniyonit tablosu veya prostaglandin salınımında artış ile giden lokal inflamasyon ortaya çıkar. Prostaglandin salınımında artış, serviksin incelmeye ve açılmasına, membran hasarına ve preterm

doğumlara yol açabilir. İntraamniyotik enfeksiyon, fetüste doğrudan enfeksiyona veya sepsise yol açabileceği gibi, enfeksiyon olmadan sitokinler aracılığı ile beyinde ak madde hasarı veya diğer organların gelişimlerinde anormalliklere yol açabilir (2) (Şekil 2).

Şekil 2: Koryoamniyonitin patofizyolojisi. Maternal/ fetal yanıt ve komplikasyonlar (2)



Hayvan deneyleri göstermiştir ki, gebelikte mikrobiyal virulans için plasentadan geçiş şart değildir. Gram negatif organizmalar LPS (endotoksin) açığa çıkararak gebe hayvanlarda sistemik inflamasyonu tetiklerler. LPS'ler ateşi indükleyen IL-1 ve TNF- α salınımını, ayrıca karaciğerden akut faz proteinlerinin salınımını indükler (10). Aynı zamanda LPS'ler plasentadan IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak fetüse ulaşmadan plasentada inflamasyona yol açarlar. Bu inflamatuar cevap sonucunda IL-1, IL-6, TNF- α gibi primer

inflatuar araciların yanı sıra uterin kasılmaları uyarabilen ve plasental kan akımını değiştirebilen prostaglandin E2 (PGE2) gibi aracilar açığa çıkar. Bu bulgular enfeksiyonların, özellikle gram negatif aerob enfeksiyonların, sistemik maternal inflamatuvar cevap ve fetal-plasental ünitede inflamasyonu içeren olaylar kaskadını başlatarak anormal gebelik sonuçlarına yol açabileceğini göstermektedir (101).

2.1.e. Epidemiyoloji

İUE'ler batı dünyası da dahil olmak üzere tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. Koryoamniyonit, A.B.D.'deki tüm doğumların %1-4'nde tespit edilmektedir (3). Ancak koryoamniyonit sıklığı teşhis yöntemlerine, risk faktörlerine ve gestasyon yaşına göre ciddi farklılıklar göstermektedir (102-105). Klinik veya histolojik koryoamniyonit sıklığı PROM veya spontan eylem ile olan tüm preterm doğumlarda %40-70 arası değişirken (106), term doğumlarda %1-13 arası değişmektedir (107-109). Batı lkelerinde ilerlemeyen doğum eylemi sebebi ile yapılan sezaryen doğumların %12'sinde klinik koryoamniyonit saptanmıştır (110). Yapılan alışmalar sayesinde koryoamniyonit için birçok risk faktörü belirlenmiştir (Tablo 1). Bunların arasında membran rüptürü süresi, uzamış doğum eylemi, ilk bebek, tekrarlayan vajinal muayeneler, amniyon sıvısının mekonyumlu olması, sigara, alkol, vajinada Grup B streptokok ve *Ureaplasma* kolonizasyonu sayılabilir (102-105,111-114). İntrauterin enfeksiyon ve inflamasyon genellikle belirti vermeden seyrettiği için sebebi belli olmayan serebral palside etiyolojide suçlanan en önemli etkidir. Grether ve arkadaşlarının yaptığı toplum tabanlı bir çalışmada, doğumda annede ateş olması veya klinik/histolojik koryoamniyonit varlığı sağlıklı bebeklerde %2.9 iken, serebral palsili çocuklarda %14.4 olarak tespit edilmiştir. Serebral palsili çocukların ise %21.7'sinde etiyolojik bir sebep tespit edilememiştir (115).

Tablo 1: Koryoamniyonit riskini artıran bazı faktörlerin rölatif riskleri (2)

Risk Faktörü	Rölatif risk
Uzamış PROM	
>12 saat	5.8 (111)
>18saat	6.9 (116)
Uzamış doğum eylemi	
İkinci safha >2 saat	3.7(116)
Aktif doğum >12 saat	4.0(112)
İlk gebelik	1.8(112)
GBS kolonizasyonu	1.7-7.2(112,113,117)
Bakteriyel vajinoz	1.7 (17,118)
Alkol ve sigara kullanımı	7.9 (116)
Mekonyum ile boyanmış amniyon sıvısı	1.4-2.3(105,112)
İnternal monitörizasyon	2.0(111)
Epidural anestezi	4.1(116)

2.2.Sitokinler

Sitokinler, hücre fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için gerekli hücreler arası iletişimi sağlayan ve büyüme, gelişme, farklılaşma ve akut cevap oluşumunda görevli moleküllerdir. Sitokinler protein yapıda olup etkilerini spesifik reseptörleri aracılığı ile gösterirler. İmmün sistemde fonksiyon gören sitokinleri inflamatuvar veya inhibitör olarak ikiye ayırmak mümkündür. Proinflamatuvar sitokinler, inflamasyona yol açan etkenin uyarısı ile ilk ortaya çıkan ve inflamasyonun artmasını, devam etmesini sağlayan moleküllerdir. En önemli proinflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-18 olarak sayılabilir (10). İntrauterin inflamasyona bağlı gelişen problemlerin ve beyin hasarının gelişimi açısından en çok suçlanan ve en çok araştırılan sitokinler proinflamatuvar sitokinlerdir (119). Bu sitokinler diğer inflamatuvar ve sitotoksik moleküllerin salgılanmasını, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu sağlayarak lökositlerin inflamasyon bölgesine çekilmesini ve oligodendrositlerde hasar oluşumuna neden olarak yenidoğanda beyin hasarına yol açmaktadırlar (120). Proinflamatuvar sitokinlerin gelişen beyin

üzerine doğrudan toksik etkileri vardır. Yenidoğan farelerde beyne direk enjekte edilen IL-1'in nöron ölümü ve gecikmiş miyelinizasyona yol açtığı gösterilmiştir (121). TNF- α 'nın muhtemelen apoptoz uyarıcı faktör üzerinden matür oligodendrosit ölümüne yol açtığı, immatür oligodendrositlerde apoptozu arttırdığı ve miyelin yapımını azalttığı gösterilmiştir (122-124).

2.2.a. TNF- α

TNF- α , gram (-) bakteri ve diğer enfeksiyon etkenlerine karşı oluşan akut inflamatuvar cevabın esas mediyatörüdür ve ciddi enfeksiyonların bir çok sistemik komplikasyonundan sorumludur. TNF- α 'nın en önemli kaynağı aktive olmuş makrofajlardır. Ama antijenle uyarılmış T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve mast hücrelerinden de salgılanır. Makrofajlardan TNF- α salınımını uyaran en önemli etken, LPS ve diğer mikrobik ürünlerdir. IFN- γ , LPS ile uyarılmış makrofajlardan TNF- α salınımını artırır. TNF- α etkisini hücre zarındaki reseptörüne bağlanarak gösterir. TNF- α 'nın en önemli etkisi nötrofil ve monositleri enfeksiyon veya inflamasyon bölgesine çekip, aktive ederek etkenin ortadan kaldırılmasını sağlamaktır. Bu etkiyi sağlamak için TNF- α :

- Vasküler endotelde adhezyon moleküllerini salgılatır (selektin, integrin),
- Vasküler endotel ve makrofajlardan kemokinlerin salınımını sağlar ve lökosit kemotaksisini artırır.
- Mononükleer fagositlerden IL-1 salınımını artırır,
- Nötrofil ve makrofajların mikrobisidal aktivitelerini artırır.

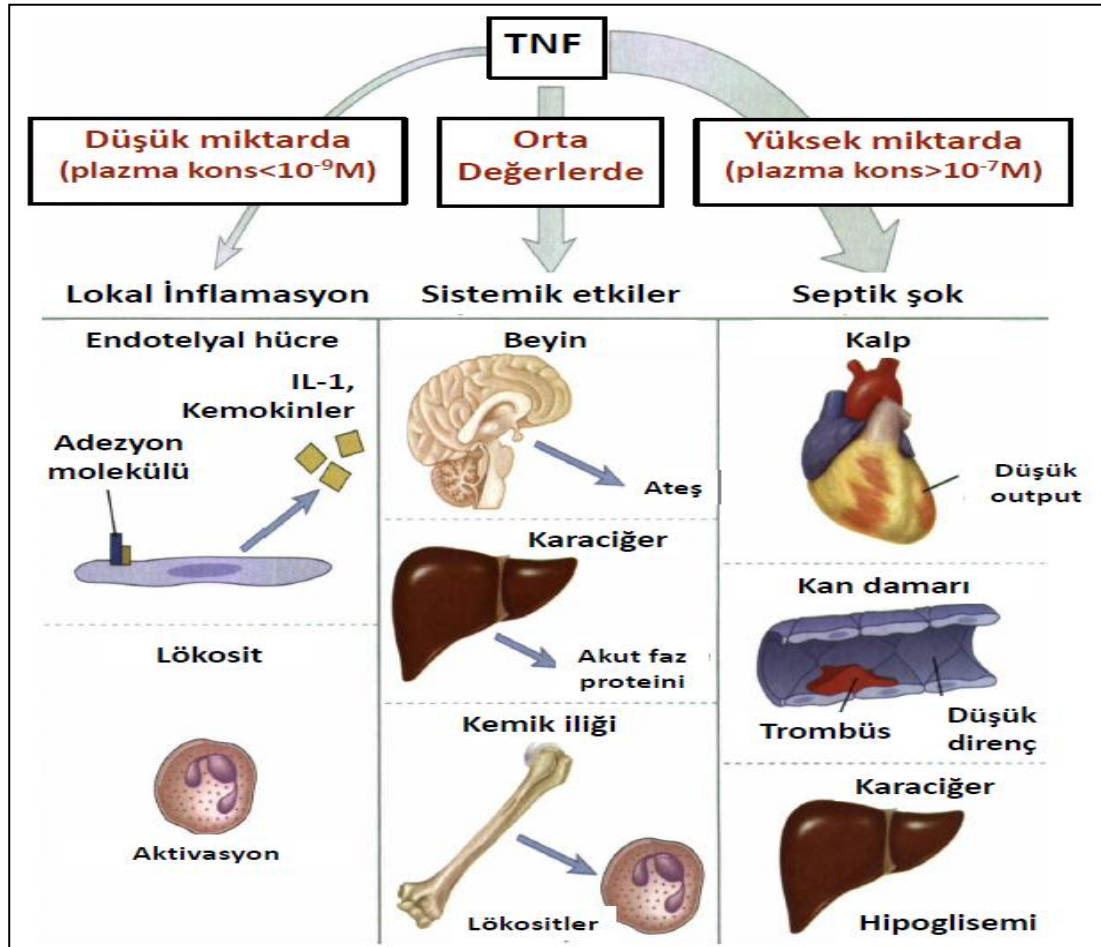
Enfeksiyonun lokalize edilmesi için gerekli olan TNF- α 'nın, ağır enfeksiyonlarda aşırı miktarda üretimi ciddi sistemik anormalliklere yol açar (şekil 3):

- Hipotalamusta sıcaklık eşiğini yükseltir ve ateşe neden olur.
- Karaciğerden, serum amiloid A ve fibrinojen gibi akut faz proteinlerinin salınımını artırır.
- Uzamış TNF- α üretimi iştahı azaltır, kas ve yağların erimesine yol açar.
- Serum konsantrasyonu 10^{-7} M'nin üzerine çıktığında kalp ve damar düz kası kontraktilesini baskılar. Bunun sonucunda şok tablosu gelişir.

- Endotelden doku faktörü salınımını artırıp ve trombomodülin salınımını azaltarak damar içi pıhtılaşmaya yol açar (10,125).

Merkezi sinir sisteminde TNF- α 'nın asıl kaynağı mikroglia'dır. TNF- α mikroglia tarafından beyin hasarına veya inflamasyona yanıt olarak salınır (126). Diğer sitokinlerin ve aracı moleküllerin salınımını uyarmak dışında oligodendrositler üzerine olan direk toksik etki ile beyin hasarına yol açabilir.

Şekil 3: TNF- α 'nın etkileri (10).



2.2.b. IL-1

IL-1, enfeksiyonlara ve diğer immün uyarılara karşı oluşan konak immün yanıtı sonucu aktive olmuş mononükleer fagositler tarafından üretilen önemli bir sitokindir. Fonksiyonları TNF- α ile benzerdir ve inflamasyon oluşumunda TNF- α ile birlikte çalışır. Mononükleer fagositler tarafından üretimi LPS gibi bakteriyel ürünler veya TNF- α gibi sitokinler tarafından uyarılır. Makrofajlar dışında nötrofil, epitelyal hücreler ve endotelial hücreler

gibi birçok hücre tarafından üretilebilir. IL-1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki formu vardır. Yapısal olarak büyük oranda farklı olsalar da aynı tip reseptöre bağlanıp, benzer fonksiyon görürler. IL-1'in etkileri TNF- α ile benzerdir ve aynı TNF- α 'da olduğu gibi üretilen miktara bağlı olarak sistemik etkileri oluşabilir. Düşük dozlarda lokal inflamasyona aracılık eder ancak yüksek miktarlarda üretilip kan dolaşımına girerse ateş, akut faz proteinlerinde artış, IL-6 üretiminin uyarılması ve kemik iliğinde nötrofil ve trombosit üretiminin artması gibi etkileri vardır. Ancak TNF- α gibi şok tablosuna yol açmaz (10,125).

2.2.c.İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, hem doğal hem de edinilmiş bağışıklıkta görevli bir sitokindir. Enfeksiyon etkenleri ve IL-1, TNF- α gibi sitokinlerin uyarıları sonucu mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve fibroblastlardan salgılanır. Ayrıca aktive olmuş T lenfositleri de IL-6 salgılayabilir. IL-6'nın aktif formu yapı olarak bir homodimerden oluşur. IL-6'nın birçok farklı işlevi vardır. Doğal bağışıklıkta, akut faz proteinlerinin ve akut faz cevabının oluşumunu uyarır. Kemik iliğinde nötrofil öncüllerinin dönüşümünü koloni uyarıcı faktörler ile birlikte çalışarak hızlandırır. Edinilmiş bağışıklıkta, B lenfositlerinin büyümesini ve plazma hücrelerine dönüşümünü uyarır. Ayrıca IL-6'nın hücre aracılıklı immün reaksiyonları bazı proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle IL-17) sentezini artırarak ve regülatuar T hücrelerini baskılayarak başlattığına dair deliller vardır (10,125).

IL-6, beyinde inflamasyona cevap olarak mikroglia ve astrositlerden salgılanır (127) ve IL-1, TNF- α ve hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) sentezinde upregülasyona neden olur (128). Ayrıca inflamatuvar yanıt dışında IL-6'nın normal beyin gelişiminde önemli fonksiyonları vardır.

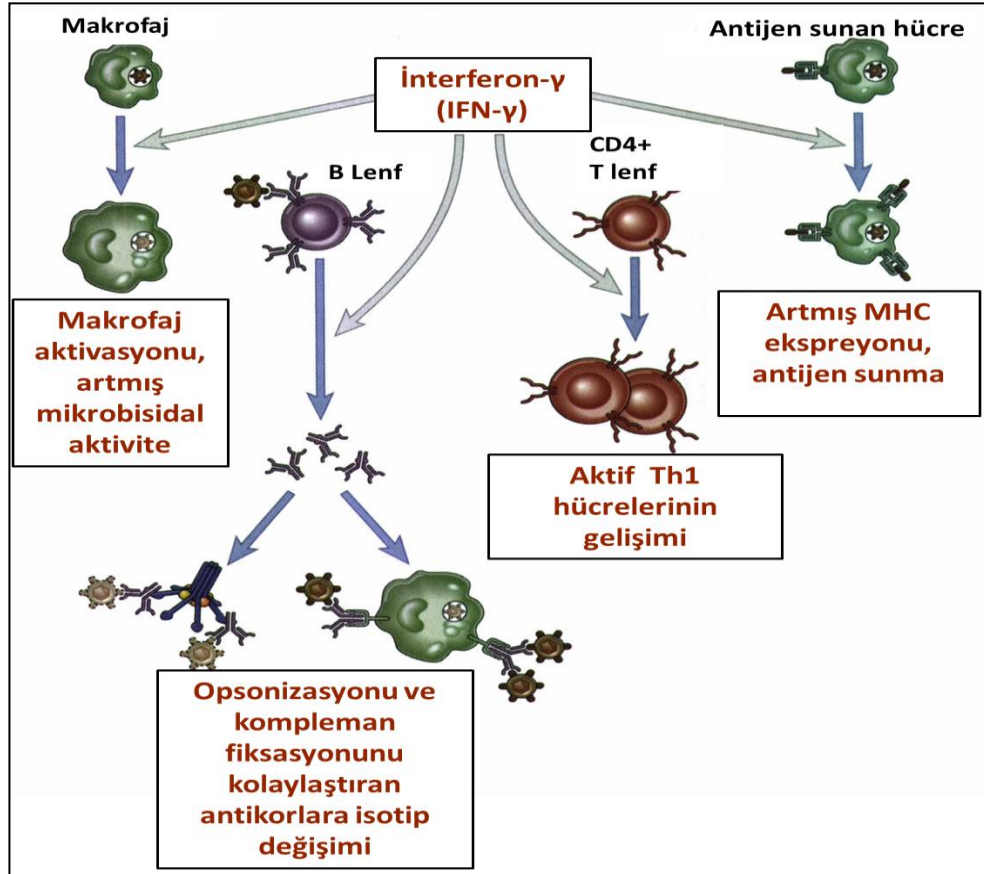
2.2.d.İnterferon-gama

IFN- γ , makrofajları aktive eden en önemli sitokindir. Hem doğal hem de adaptif immünitede önemli görevleri vardır. IFN- γ , NK hücreleri, CD4+ Th1 hücreleri, CD8+ T hücreleri tarafından salgılanır. NK hücreleri tarafından veya IL-12 uyarısı ile salgılandığında doğal bağışıklığın bir aracısı olarak

işlev görürken, spesifik antijen tanıma olayına reaksiyon olarak T hücrelerinden salgılandığında edinilmiş bağışıklık işlevlerinde rol alır. Hücre içi mikroorganizmalara karşı hücre aracılıklı bağışıklıkta IL-12 ile birlikte önemli rol oynar (10). IFN- γ , bu fonksiyonları yerine getirirken:

- Makrofajların mikrobisidal aktivitelerini artırır,
- Th1/Th2 dengesini Th1 lehine çevirir ve antimikrobiyal aktiviteyi artırır,
- B lenfositlerinden IgG1 ve IgE üretimini azaltıp IgG2 üretimini artırarak opsonizasyonu ve makrofaj fonksiyonlarını artırır,
- Antijen sunan hücrelerdeki MHC I ve MHC II moleküllerini artırarak T hücre aktivasyonunu uyarır (Şekil 4)

Şekil 4: IFN- γ 'nın etkileri (10).



2.3.İntrauterin inflamasyonun fetüs üzerine etkileri

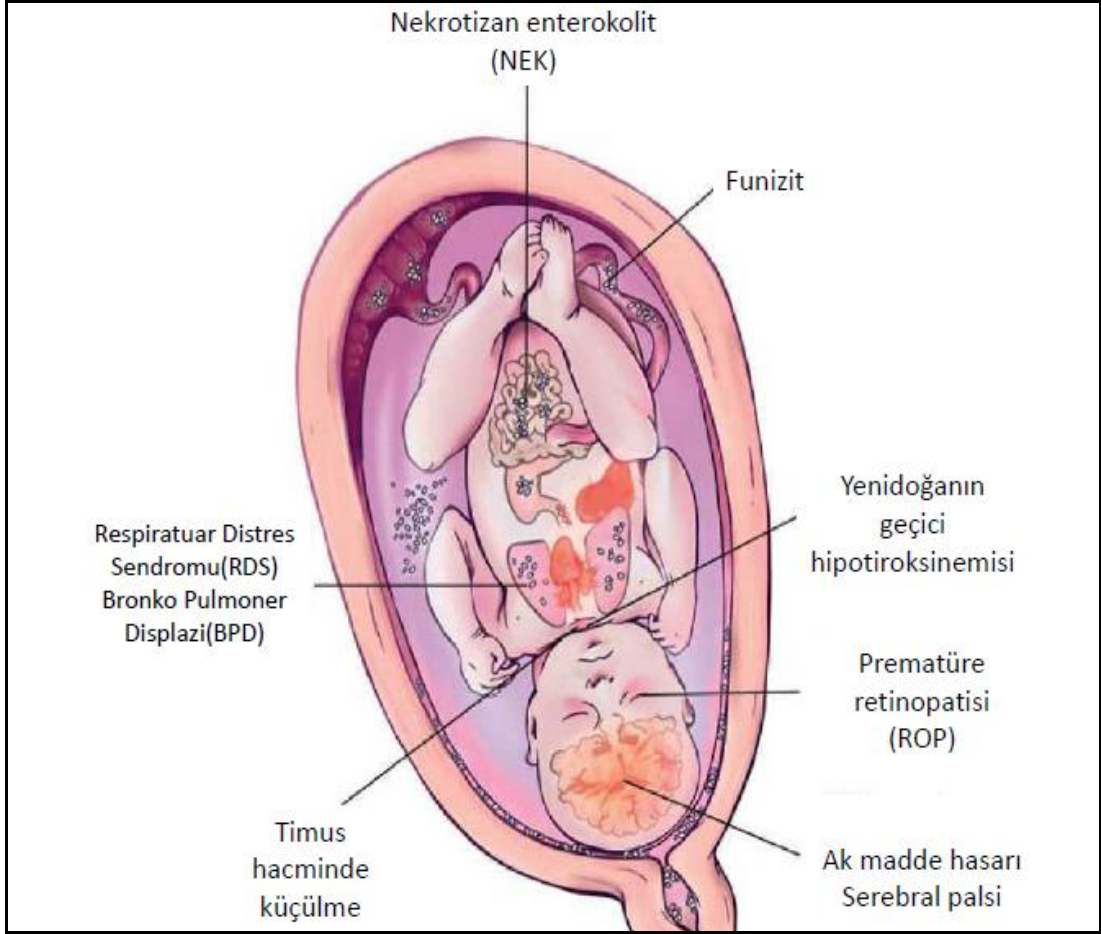
Koryoamniyonitlerin önemli bir bölümü antenatal dönemde belirti vermez. Ancak ciddi vakalarda ateş, lökositoz, artmış CRP düzeyi gibi sistemik veya vajinal akıntı, uterus hassasiyeti gibi lokal belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Koryoamniyonitte, fetal inflamasyon bulgularının olmasının (funizit, artmış kord IL-6 seviyesi), inflamasyonun fetüs açısından daha ciddi bir yönünü yansıttığı düşünülmektedir (11). Fetüs inflamasyona ya direkt amniyon sıvısı ile ya da plasental-fetal dolaşım ile maruz kalır. Koryoamniyonit ve ortaya çıkan inflamasyona, ilerleyen süreçte fetüsün verdiği tepki FİCS olarak isimlendirilir (11). FİCS genellikle subklinik olarak seyreden, fetüste proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açan immün sistem aktivasyonu ile karakterize bir durumdur (129). Esas olarak kordosentezle alınan örneklerde fetal venöz plazma IL-6 seviyelerinin 11 pg/ml'nin üzerine yükselmesi olarak tanımlanmıştır. Yakın zamanda yüksek IL-6 seviyeleri ile funizit arasında yüksek derecede anlamlı ilişki olduğunun tespit edilmiş olmasından dolayı, FİCS'in tanımı yüksek IL-6 seviyeleri ve/veya funizit varlığını içerecek şekilde genişletilmiştir (130). FİCS preterm eylemdeki kadınların bir kısmında ve PROM'lu kadınlarda mevcuttur. FİCS'in tokolize cevapsızlıkla ve multisistem tutulumuna ek olarak PVL, serebral palsy, fetal sepsis, fetal kardiyak disfonksiyon, hipotiroidi, prematüre retinopatisi (ROP) ve BPD gibi fetal-neonatal morbiditelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (12,15,17,19) (şekil 5).

2.3.a.Prematür membran rüptürü ve preterm doğum

PROM, doğum eylemi başlamadan membranların yırtılması olarak tanımlanmaktadır. Bu durum 37. gebelik haftasından sonra gerçekleşirse "term PROM", bundan önce gerçekleşirse "preterm PROM (pPROM)" olarak isimlendirilir. İlerleyici membran zayıflamasının fizyolojik bir sonucu olan term PROM, termdeki hastaların %8'inde görülür ve çoğu zaman spontan doğum eylemi ve doğum ile sonuçlanır. En önemli komplikasyonları intrauterin enfeksiyon ve umbilikal kord basısıdır. Preterm doğumların yaklaşık 1/3'ünde PROM mevcuttur (131). pPROM birlikte etki eden çok çeşitli patolojik mekanizmalardan kaynaklanabilir. İntraamniyotik enfeksiyonun pPROM'la,

özellikle de pPROM 30. gestasyon haftasından önce gerçekleşiyorsa sıklıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (22). pPROM hastalarının %13-60'ında klinik olarak belirgin intraamniyotik enfeksiyon bulguları mevcuttur. Fetüs için en önemli riskler prematüriteye bağlı olarak gelişenlerdir. Pulmoner ve nörolojik problemler preterm doğumlarda karşılaşılan en önemli komplikasyonlardır.

Şekil 5: İntrauterin inflamasyonun komplikasyonları (4).



Antenatal bakımdaki ciddi ilerlemelere rağmen, preterm doğum halen tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. Batı ülkelerinde preterm doğum oranı tüm canlı doğumların %5-13'ünü oluşturur (13). Çocuklardaki uzun dönem nörolojik hasarların yarısından preterm doğumlar sorumludur (14). Doğumu başlatan fizyolojik mekanizmalar tam olarak bilinmese de amniyotik boşluğun enfeksiyonu hem term hem de preterm doğum ile ilişkili önemli bir faktördür (132-136). İnflamasyon, preterm doğumlarda olduğu kadar spontan term doğumlarda da önemlidir ve normal doğum fizyolojisinde doğum eylemini

başlatan faktörlerden biridir. Ancak buradaki fark inflamasyonun başlama zamanı, inflamasyona yol açan etken mikroorganizma ve amniyotik sıvı sitokin düzeyleridir (135-138). Preterm doğumlar multifaktoriyel bir doğuya sahiptir. Preterm doğumlarla ilişkili olduğu gösterilen faktörler bakteriyel vajinoz, preterm doğum öyküsü, abortus, düşük doğum ağırlıklı bebek doğurma öyküsü, sigara, alkol, genitoüriner sistem enfeksiyonları ve primigravid olmaktır (139). Preterm doğuma ailesel yatkınlığın da söz konusu olması nedeniyle etiolojide çeşitli genetik faktörlerin de rol alabileceği düşünülmektedir. Preterm doğumlar klinik prezentasyonuna göre genellikle spontan preterm doğumlar (%50), pPROM (%30) ve iyatrojenik maternal ya da fetal komplikasyonlar nedeniyle tıbbi olarak endike preterm doğumlar (%20) şeklinde sınıflandırılır (131).

Preterm doğum hem akut hem de kronik intrauterin enfeksiyon ve inflamasyonla ilişkilidir. Bakteriyel vajinoz, asemptomatik bile olsa preterm doğumun güçlü bir prediktörüdür ve sistemik maternal inflamatuvar cevap ile ilişkili bulunmuştur (15). Koryoamniyonitli bebeklerin %80'den fazlası 28 haftanın altında doğmaktadır ve büyük kısmı klinik olarak belirti vermez (140,141). Bu hastaların çoğunda tanı, doğumdan sonra amniyon sıvı kültürü veya histolojik inceleme ile konulur (7). Otuz haftanın altında doğan bebeklerde, amniyon sıvısında proinflamatuvar sitokin düzeyi daha yüksek saptanmıştır (16). Özellikle amniyon sıvısında IL-6'nın ikinci trimesterde yüksek tespit edilmesinin preterm doğum için önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir (142). 1960'lardan itibaren yapılan hayvan çalışmalarında gebelikte enfeksiyöz ajanlara maruziyetin fetüsün gelişiminde bozulma ve abortuslara veya preterm doğumlara neden olabileceği gösterilmiştir (31,63,133,143).

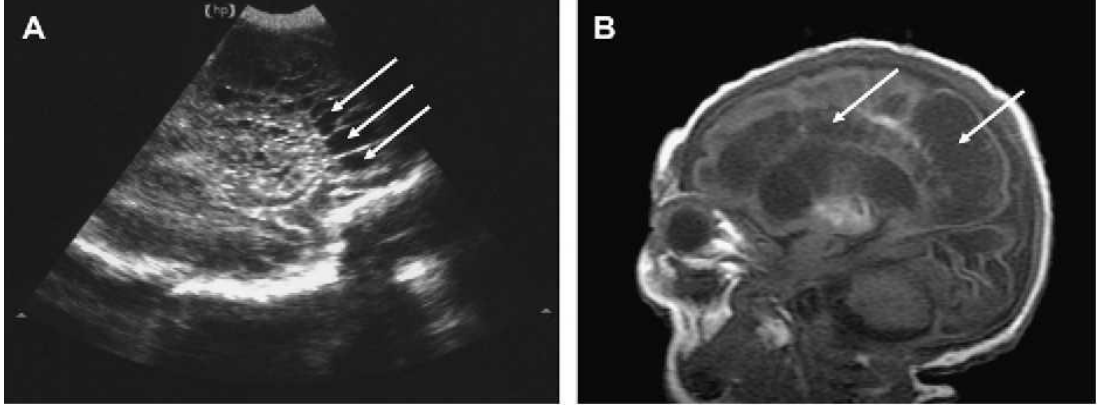
2.3.b.Merkezi sinir sistemine (MSS) etkileri

Antenatal ve perinatal dönemde beynin, inflamatuvar aracılıklı olaylar için önemli bir hedef olduğu ve sitokinlerin bu olaylarda önemli görevler üstlendikleri günümüzde artık açık bir şekilde anlaşılmıştır. Değişik gestasyon haftalarında beyin gelişiminin farklı safhalarındaki etkilenmeler hayat boyu etkili olabilecek problemlere yol açabilir. Perinatal beyin hasarı; gelişme

serebral palsy gelişmesi için güçlü ve bağımsız risk faktörleri olduğu saptanmıştır (22). Ayrıca bu bebeklerde intraamniyotik proinflatuar sitokin (IL-6, IL-8) düzeylerinin de yükseldiği tespit edilmiştir. Antenatal inflamasyon ve sitokin düzeyleri ile ilgili yapılan bir başka çalışmada amniyotik sıvıda artmış IL-6, IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin ak madde hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (151,152).

Otuziki haftanın altında doğan prematüre bebeklerde en sık görülen beyin hasarı yaygın veya fokal ak madde hasarı veya PVL'dir (24) (Şekil 7). Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çalışmaları çok küçük preterm bebeklerin %21'inde ak madde hasarı olduğunu göstermiştir (154). Klinik çalışmalar antenatal dönemde inflamasyona maruz kalan bebeklerde PVL ve serebral palsy gelişme riskinin belirgin derecede arttığını göstermiştir (25,26). Otuz haftanın altında doğan pretermilerin postnatal ilk hafta içinde beyin MRG'lerinin incelendiği bir çalışmada, bebeklerin yarısından fazlasında beyin anormallikleri saptanmış, bu anormalliklerin çoğunun eski lezyonlar olduğu ve kord kanından bakılan proinflatuar sitokin düzeylerinin beyin hasarı tespit edilen bebeklerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (155). İnflatuar cevabın ve doku hasarının derecesi fetüsün gestasyon yaşı ile yakın ilişkilidir. Fetüs 13 haftalık iken koryoamniyotik enfeksiyonlara karşı immün cevabı çok kısıtlıdır. Fetüs 16-22. haftadan itibaren immün yanıt oluşturmaya başlar (156). İU'ye bağlı beyin hasarının oluşumuna dair patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak son bulgular annedeki veya fetüsteki sistemik immün cevaptan daha çok fetüs beynindeki lokal inflamasyonun daha etkili olduğunu göstermektedir. Sitokinlerin beyin hasarına yol açmasında 3 önemli faktör etkilidir. Birincisi inflamasyonun hangi seviyede olduğudur. Lokal nöroinflamasyon, sistemik inflamasyona göre daha önemlidir. İkinci olarak farklı olaylarda sitokinlerin görevleri ve oluşturduğu nöroinflatuar etki değişebilir. Üçüncüsü ise immatür beyin gelişme derecesine göre sitokinlerin etkileri değişebilmektedir (119).

Şekil 7: Periventriküler lökomalazi. Ok ile işaretli bölgeler ak maddedeki kistik alanları göstermektedir (153).



Literatürde annede oluşan inflamasyon ve üretilen sitokinlerin fetüse geçişi konusundaki bilgiler çelişkilidir. Bazı çalışmalarda annedeki inflamasyon sonrası fetüs beyinde IL-1 β , TNF- α ve IL-6 düzeylerinin yükseldiğini bildirilirken (157,158) bazı çalışmalarda ise TNF- α ve IL-1 β 'nin anneden fetüse geçmediği, IL-6'nın ise az miktarda geçebildiği bildirilmiştir (159,160). Ancak hayvan deneylerinde anneye LPS enjeksiyonu sonrasında fetüs beyinde artmış proinflamatuvar sitokin mRNA düzeylerinin tespit edilmesi, bu sitokinlerin beyin dokusu içinde üretildiğini, lokal inflamasyonun sistemik inflamasyonun devamı şeklinde ortaya çıktığını ve inflamasyona bağlı beyin hasarı gelişiminde asıl önemli faktör olduğunu kanıtlamıştır (28-30). İnflamasyonun beyin dokusuna nasıl iletildiğine dair mekanizmalar halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Sitokinlerin, MSS'de değişik hücre grupları üzerine olan bu olumsuz etkilerine rağmen aynı zamanda normal beyin gelişimi, rejenerasyonu ve fonksiyonları için gerekli olduğu gösterilmiştir. Proinflamatuvar (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ) veya antiinflamatuvar (IL-4, IL-10) sitokin reseptörleri beyinde birçok hücrede bulunur ve beyin gelişimi ve fonksiyonunda çok önemli görevleri vardır. IL-1 β , astrositler, mikroglia, oligodendrosit öncülleri ve farklılaşmış oligodendrositler tarafından salgılandığında diğer sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını uyarır ve inflamatuvar olayları başlatır (161). TNF- α 'nın inflamatuvar ve nörotoksik etkileri olduğu bilinir ama aynı zamanda beyin gelişimi ve fonksiyonunda da önemli görevleri vardır. TNF- α , embriyonik dönemde beyinde fazla miktarda üretilir. TNF- α 'nın primer

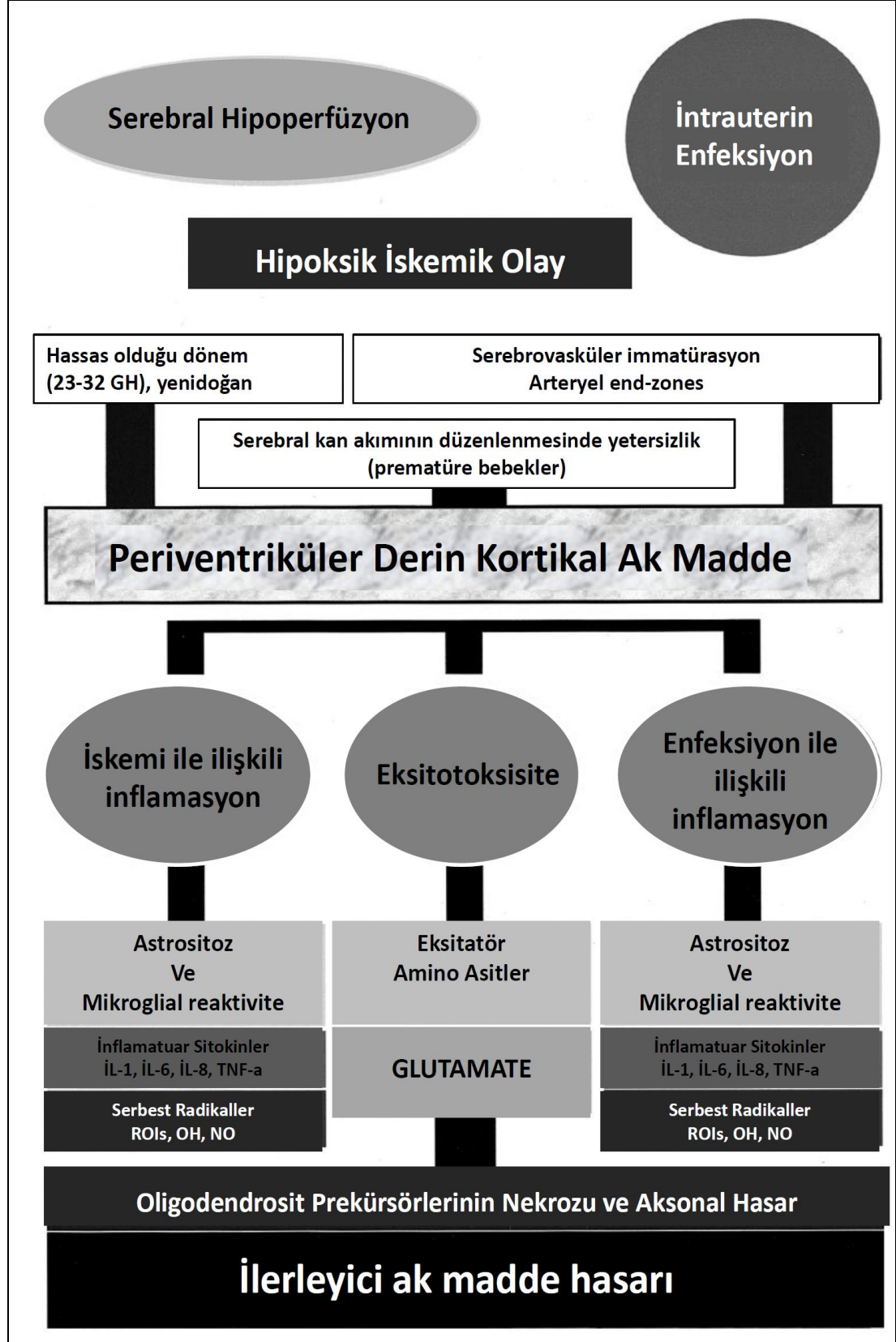
astrozitler üzerine proliferasyonu arttırıcı nöronlar üzerinde ise büyüme hızlandırıcı etkisi vardır (162,163). Fetüste, TNF- α ve IL-1 β kortikal plağın gelişme safhasında yoğun sinaptogeneze glial hücreler tarafından normal gelişim için salgılanır (164). Ayrıca kemirgenlerde IL-1 β ve TNF- α 'nın astrozitlerden nöronal büyüme faktörü (NGF) salınımını artırarak nöron gelişimini desteklediği gösterilmiştir (165). NGF'nin, perinatal dönemde nöroprotektif ve oligodendrosit gelişimine yardımcı etkileri vardır (166,167).

2.3.b.1. Beyin hasarının patofizyolojisi

Intrauterin inflamasyonda ortaya çıkan ak madde hasarına bağlı olarak beyin toplam ağırlığının azaldığı saptanmıştır (168). PVL'de lezyonlar kortikospinal yol, talamokortikal lifler, superior oksipitofrontal fasikül ve superior longitudinal fasikül gibi geniş bir alanı etkileyebilir (169). Deneysel çalışmalar inflamasyona bağlı aşırı üretilen sitokinlerin oligodendrosit ve onların öncülleri üzerine toksik etkileri olduğunu göstermiştir (31). Ayrıca intrauterin inflamasyon, astrozitlerin uyarılmasına ve myelin ile ilişkili genlerin downregülasyonuna neden olmaktadır (32,33). Kadhim ve arkadaşları, IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde yükseklik ve makrofaj infiltrasyonunun PVL'nin erken dönemlerinde patolojik olarak tespit edilebildiğini göstermiştir (170,171). Tüm bu etkilerin sonucunda koryoamniyonitli bebeklerde PVL ve peri veya intraventriküler kanama sıklığı belirgin derecede artmıştır (172). İÜ'nin araştırıldığı hayvan deneylerinde, inflamasyonun ak maddede mikroglia aktivasyonuna, astrozitlerin zarar görmesine ve oligodendrositlerin azalmasına yol açtığı, beyin yapısında ise subkortikal ak madde, striatum, hipokampus gibi subkortikal bölgelerde nöronal hasara yol açtığı gösterilmiştir (34). Ayrıca IL-1, TNF- α ve IL-6'nın nöronal kültürlerde dentrit sayısı ve uzunluğunu azalttığı tespit edilmiştir (173) (Şekil 8). MSS'deki doğal bağışıklık sistemini glial hücreler (astrozit, mikroglia) oluşturur. Mikroglia beyinde doğal ve kazanılmış bağışıklık işlevlerindeki en önemli bileşendir. Mikroglianın, fetal dönemde beyin dokusu içine yerleşen CD45+ myeloid öncüllerinden farklılaştığı ve immün sistemin bir uzantısı olduğu düşünülmektedir (175,176). Mikroglianın görevleri tam olarak anlaşılabilmiş olmasa da glial hücrelerin beyin parankiminin korunması, hasarlı nöronların

rejenerasyonu, ölü nöronların uzaklaştırılması, nöroinflamasyon ve enfeksiyon, travma, iskemi gibi durumlarda önemli işlevleri olduğunu gösterilmiştir (177). Ayrıca NGF, brain-derived nörotrofik faktör (BDNF), glial cell line-derived nörotrofik faktör (GDNF) gibi büyüme faktörlerini salgılayarak nöron gelişimini düzenleyici etkileri olduğu da saptanmıştır (178-181). Astrositlerin değişik nörotransmitterlerin salgılanması, nöronlar için gerekli beslenme ve büyüme faktörlerinin sağlanması, monosit ve lenfositlerin hareketlerinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri vardır (182,183). Son bilgiler astrositlerin MSS'de aynı zamanda önemli bir immün düzenleyici olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Astrositlerin, MHC I ve MHC II üretilen antijen sunan hücre gibi fonksiyonları vardır. Ayrıca endotel üzerine direkt etki ederek kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini değiştirerek lökosit göçünü etkilerler (184). Astrositler, IL-1, TNF- α ve IFN'lar gibi sitokinleri de salgılayabilirler (185). Normal beyinde, fonksiyonları bozulmuş olan nöronların ortadan kaldırılmasında glial hücrelerin aracı olduğu inflamasyon gereklidir.

Şekil 8: İnflamasyon ve sık görülen diğer sebeplere bağlı olarak oluşan beyin hasarının patofizyolojisi (174).



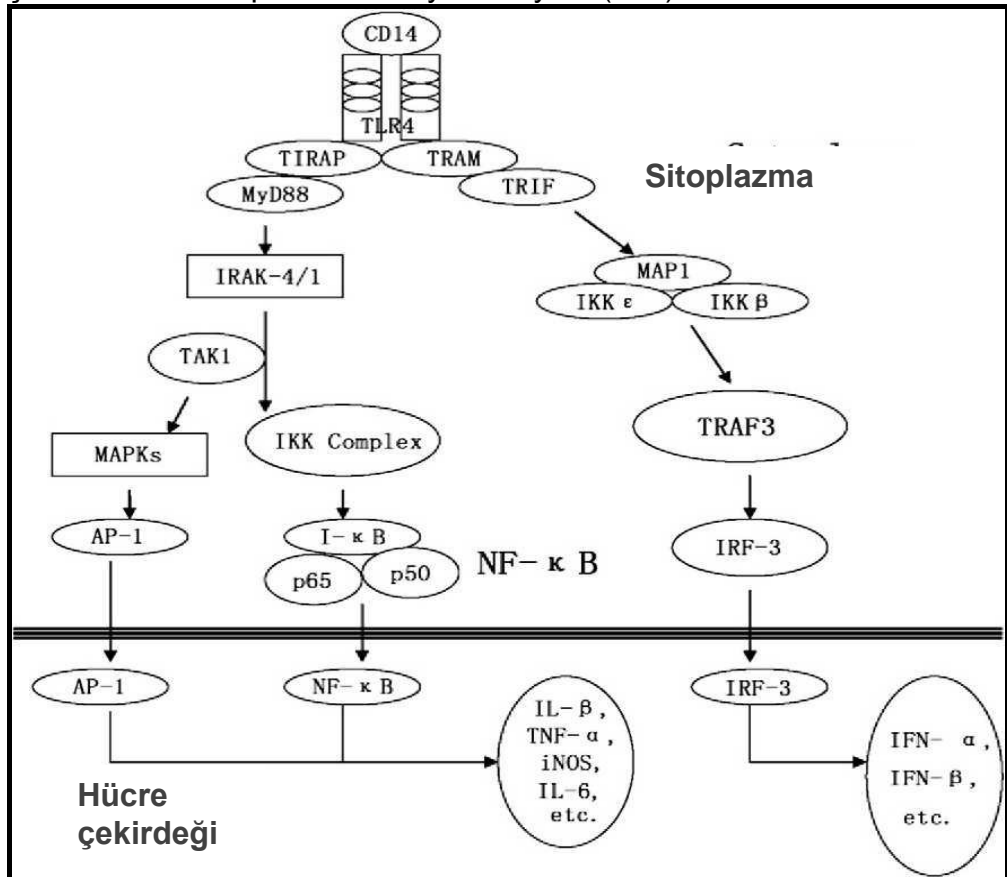
2.3.b.2.Glial aktivasyon

Glial aktivasyon, ak madde hasarının ortaya çıkması için önemli bir basamaktır. İnflamasyon ve glial aktivasyon, yenidoğan ve erişkinde demiyelinizan hastalıklar, beyin travması, hipoksik-iskemik, mental hastalıklar gibi durumların patofizyolojisinde yer alır (186). İnflamasyonun oluşması için glial hücrelerin proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β , IL-6, TNF- α) ile aktivasyonu gereklidir. Mikroglial aktivasyon gelişen beyinde eksitotoksik, inflamatuvar ve serbest radikal hasarı için gereklidir (81,187). Kültüre edilen mikroglia, IL-1, IFN- γ , TNF- α , LPS veya peptidoglikan ile uyarıldığında nöronlar ve oligodendrositler üzerine toksik olan reaktif oksijen ürünleri ve nitrik oksit (NO) üretiminde artış olduğu ve proinflamatuvar sitokinleri salgıladığı gösterilmiştir (188,189). Hasar mekanizmalarında, preterm beyindeki immatür oligodendrositler ana hedef hücrelerdir (190,191).

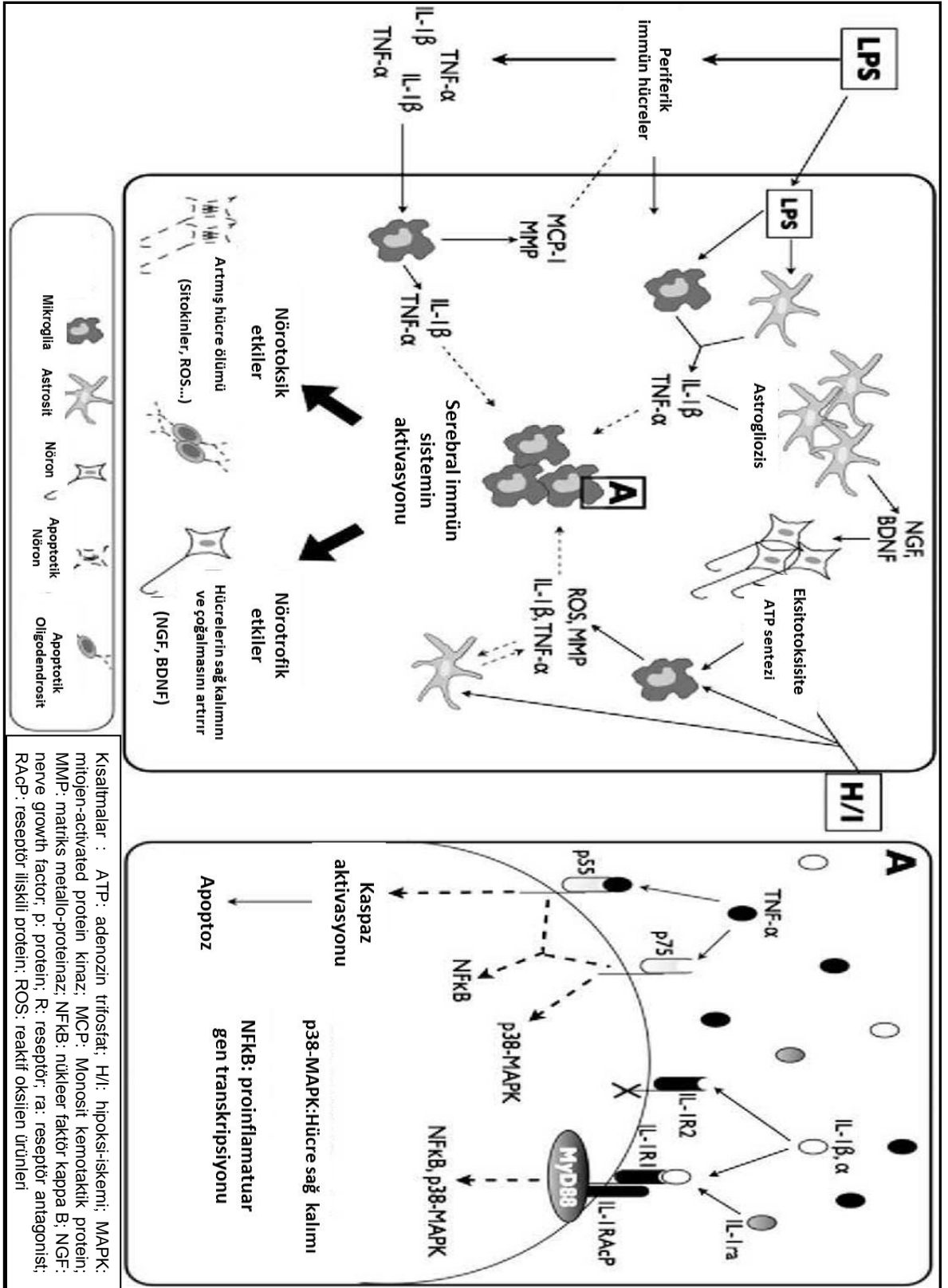
Son dönemlerde ortaya konan bilgiler, doğal bağışıklığın ve toll-like reseptörlerin (TLR), MSS'deki immün reaksiyonların önemli bir bileşeni olduğunu göstermiştir. Doğal bağışıklık ve bu sistemin bir parçası olan TLR'ler beyin değişik patojen ve antijenlere karşı savunmasındaki en önemli sistemdir. Günümüzde insanda 11 farklı TLR tanımlanmıştır. Her TLR bakteriyel ve fungal patojenlerin genel yapısal özellik gösteren spesifik bir parçasını tanır. Özellikle TLR4, LPS'nin mikroglia tarafından tanınması ve algılanmasında önemlidir (192,193). TLR4, tip 1 integral glikoprotein özelliğinde bir membran reseptörüdür. Ekstrasellüler parçadaki lösinden zengin tekrarlar (LRR) LPS ile etkileşir. Sitoplazmik parçası toll/IL-1 reseptör bölgesi (TIR) olarak isimlendirilir. TLR4 sinyal iletimi TIR aracılığı ile birçok hücre içi düzenleyici proteinin, protein kinazların ve transkripsiyon faktörlerinin aktiflenmesi ile olmaktadır. TLR ile ilişkili 4 düzenleyici protein saptanmıştır: Myeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88), MyD88 benzeri/TIR ile ilişkili protein (MAL/TRAP), toll reseptörü ile ilişkili interferon aktivatörü (TRIF), ve toll reseptör ilişkili molekül (TRAM). TLR4, LPS'nin bağlanması, MyD88 veya MAL/TRAP'ın aktiflenmesi mitojenle aktive olmuş protein kinazların (ERK1/2, p38, JNK, NF- κ B) ve transkripsiyon faktörlerinin (IRF-5, AP-1) uyarılmasını sağlayarak proinflamatuvar sitokin salınımını artırır. Ayrıca TRAM ve TRIF yolu ile IRF-3 üzerinden tip 1 interferonların (IFN- α , IFN- β)

üretimini artırır (194,195) (Şekil 9). Proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin artmasında nükleer faktör-kappa (NF- κ B) yolağının aktiflenmesi önemlidir (197). Peptidoglikan ile aktiflenen TLR1 ve TLR2'nin ilk trimester trofoblastlarında apoptoza yol açtığı ve TLR6'nın ise NF- κ B aktivasyonu ile trofoblastlardan IL-8 ve IL-6 salınımına yol açtığı gösterilmiştir (198). Ayrıca TLR'lerin birçok otoimmün hastalığın patofizyolojisinde inflamasyonu başlatıcı veya arttırıcı özelliği tespit edilmiştir (199). TLR'ler aynı zamanda virüslere karşı savunmada da önemlidir (200). TLR'ler beyinde bir çok hücrede tespit edilmiştir ancak değişik hücre tiplerinde bulunan çeşitleri farklıdır. İmmün sistemin bir uzantısı olan mikroglialar çeşitli tiplerde TLR (TLR1-9) üretebilirler (201,202). Astrositlerde de daha düşük düzeyde TLR tespit edilmiştir.

Şekil 9: TLR reseptörünün sinyal ileti yolu (196).



Şekil 10: Yenidoğanda perinatal beyin hasarına yol açan nörotoksik ve nörotrofik etkilerin moleküler yolları. A ile tanımlanan alan hücre içi mekanizmaları göstermektedir (213).



İnflamatuar olaylar (mikroglialının ve doğal bağışıklığın aktivasyonu) inflammatuar sitokinler, glutamat, NO, oksijen radikalleri gibi toksik ürünlerin salınımına yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır (203-206). Yakın dönemde yapılan bir çalışmada, inflamasyonun uyarılabilir nitrik oksit sentaz (İNOS) ve NO arttırıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir (204). Yenidoğan r Sıçan beynine LPS enjeksiyonu sonrası sitokinlerin artışı ile birlikte İNOS düzeylerinin arttığı ve üretilen NO'nun nörotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır (207,208). TLR'lerin NO salınımının düzenlenmesinde önemli etkileri vardır. LPS'nin CD14 ile etkileşerek TLR4 ile birleşmesi sonrası aktive olan NF-κB'nin, sinyalin hücre çekirdeğine iletilip İNOS üretiminin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (209). Ayrıca aktive olmuş mikroglia çevresine reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri salgılayarak oligodendrositlerin zarar görmesine neden olur (210). Bu çalışmalar intrauterin enfeksiyon veya inflamasyonun sadece sitokin (IL-1, TNF-α) seviyeleri veya inflammatuar aracıları (İNOS, NO) arttırarak değil, aynı zamanda iletim yollarını da (NF-κB) aktifleştirdiğini göstermektedir (28,196,204,211,212) (Şekil 10).

2.3.b.3.Nöroinflamasyonun iki yüzü

MSS'de inflammatuar sitokinlerin ve nörotrofik faktörlerin salgılanmalarındaki birliktelik giderek daha çok dikkat çekmeye başlamıştır. BDNF ve GDNF sadece glial hücrelerden değil, aynı zamanda immün hücreler tarafından da salgılanmaktadır (214). Bunun aksine multiple skleroz gibi otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynayan B lenfosit aktive edici faktör, aynı zamanda astrositler tarafından üretilmektedir (215).

TNF-α gibi nörotoksik özellikleri olan proinflammatuar sitokinlerin aynı zamanda koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır (216). Bu sayede inflamasyon immatür beyinde başka tip hasarlara karşı bir direnç sağlayabilir (217). Örneğin fokal beyin iskemisi modelinde, TNF-α reseptör knockout farelerdeki beyin hasarının, normal farelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (216). Başka bir çalışmada hipoksik-iskemik atak modelinden 24 saat önce LPS uygulanmasının hasarı %78 oranında azalttığı saptanmıştır (218). Benzer koruyucu etkiler başka modellerde de gözlenmiştir (217,219-223). Bu bulgular inflamasyonun kısa süreli ani etkileyen bir faktörden daha çok

dinamik ve uzun sürede farklı etkilere sahip bir süreç olduğunu desteklemektedir. Ayrıca astrositlerin TNF- α uyarısı ile BDNF salgıladığı gözlenmiştir (224).

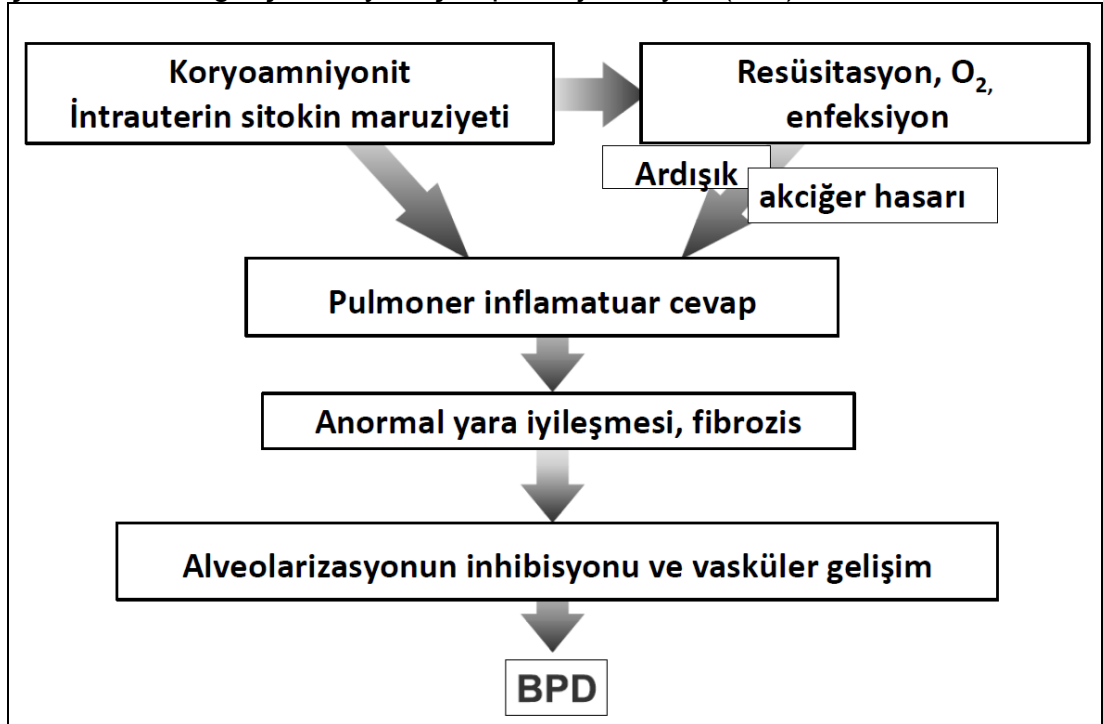
Nöroinflamasyon, proinflamasyonun yanında antiinflamatuvar kaskadı da başlatır (225). Ayrıca negatif feedback mekanizmaları inflamasyonun ilerlemesini yavaşlatır. Glial hücrelerden TNF- α ve IL-6'nın akut olarak salınımı aynı zamanda bir antiinflamatuvar olan IL-10 salınımını da uyararak inflamatuvar cevabın azaltılmasına yardımcı olur (226-228). Myelin basic proteine spesifik T lenfositlerinin ilk hasarı oluşturduktan sonra aktivitelerinde azalma olduğu ve inflamasyonun kısıtlandığı saptanmıştır (229). TNF- α ve IL-6 aynı zamanda BDNF ve NGF'nin salınımını uyararak nöronlar ve astrositler üzerinde koruyucu etki yapmaktadır (230).

2.3.c.Akciğerler

Intrauterin enfeksiyon veya inflamasyon akciğerleri doğrudan etkileyebileceği gibi, preterm doğuma neden olarak dolaylı olarak akciğer gelişimini bozabilmektedir. Birçok postnatal faktörün (mekanik ventilasyon, yüksek oksijen, erken enfeksiyon) akciğerlerde inflamasyona neden olduğu bilinmektedir (231,232). Ancak bu inflamasyonun prematüre bebeklerin bir kısmında prenatal dönemde başladığı gösterilmiştir. Watterberg ve arkadaşları koryoamniyonitin, preterm bebeklerin postnatal trakeal aspiratlarından alınan örneklerdeki yüksek IL-1 β düzeyi ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (233). Bu çalışmada, hem koryoamniyonit hem de trakeal aspiratta inflamasyon bulgularının olması BPD gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Amniyosentez yapılan 69 preterm bebekte yapılan bir çalışmada, amniyotik sıvıda yüksek IL-6, TNF- α , IL-1 β ve IL-8 düzeylerinin BPD gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (151). BPD ile ilişkili bulunan bu inflamatuvar sitokinler doku hasarı, hava yolu hücrelerinde apoptoz, mikrovasküler geçirgenlikte artış ve havayollarına lökosit göçüne neden olarak inflamasyonu şiddetlendirmektedirler (234). İnflamasyona bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı ve iyileştirme mekanizmaları uzun dönemde fibrozise yol açarak BPD patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Şekil 11). Bununla beraber prenatal inflamasyonun akciğer maturasyonunu hızlandırıcı etkisi vardır.

İntraamniyotik IL-1 uygulanan tavşanlarda, anormal akciğer gelişiminin yanında surfaktan protein A sentezinin arttığı saptanmıştır (236). Jobe ve arkadaşlarının koyunlarda yaptığı bir çalışmada intraamniyotik uygulanan LPS'nin kortizolden bağımsız olarak akciğer maturasyonunda ve surfaktan sentezinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (237). Daha sonra yapılan çalışmalarda, akciğer inflamasyonu ve maturasyonuna yol açan en önemli aracı molekülün IL-1 olduğunu saptamışlardır (238). Bu bulguların yansıması olarak klinik çalışmalarda histolojik koryoamniyonit, yüksek kan IL-6 düzeyi, bakteriyel kolonizasyon ve PROM'un, respiratuar distress sendromu (RDS) gelişimini azalttığı gösterilmiştir (233,239,240). Ancak prenatal inflamasyonun akciğer gelişimi üzerine olan olumlu etkileri ile birlikte postnatal erken dönemdeki faydaları, uzun dönemde BPD ve astım gelişme riski açısından olumlu sonuçlanmamaktadır. Birçok epidemiyolojik çalışma koryoamniyonit ile BPD gelişimi arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermiştir (233,241-243).

Şekil 11: BPD gelişimine yol açan patolojik olaylar (235).



2.3.d.Diğer organlar

Intrauterin inflamasyonun birçok organ sistemi üzerine hem gelişimleri hem de postnatal komplikasyonlar açısından olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. ROP, prematüre bebeklerde disorganize retinal damar gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Hafif görme kusurlarından körlüğe kadar değişebilen problemlere yol açabilir. Patofizyolojisinde oksijen toksisitesi ve rölatif hipoksi rol oynasa da, son dönemde yapılan bir çalışmada koryoamniyonitin şiddetli ROP ile pozitif korele olduğu saptanmıştır (244). Geçici prematüre hipotiroksinemisi, prematüre bebeklerde en sık rastlanan tiroid fonksiyon bozukluğudur. De Felice ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada histolojik koryoamniyonitin geçici prematüre hipotiroksinemisi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (245). Bunların dışında antenatal inflamasyonun deri, kardiyovasküler sistem, karaciğer, timüs, adrenal bez gibi çok çeşitli organlar üzerine olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır.

2.4.Hayvan deneyleri

Hayvan çalışmalarından edinilen bilgiler, inflamasyon ve enfeksiyonun gelişmekte olan beyinde doğrudan hasara neden olabildiğini göstermiştir (246-248). Hücrel mekanizmalar halen çok anlaşılabilmiş olmasa da immatür oligodendrositlerin hipoksik-iskemik, eksitotoksik ve inflamatuvar hasara karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir (249). Deneysel olarak intraamniyotik veya sistemik endotoksin uygulaması fetüste myelinizasyonda bozulmaya yol açmaktadır (250). İnflamasyon tüm beyni etkileyebilse de bölgesel ve hücrel farklılıklar belirgindir. Örneğin spinal oligodendrositlere göre beyin ve serebellumdaki oligodendrositler daha çok etkilenmektedir (251). Oligodendrosit öncüllerinde oluşacak hasar myelin oluşumunu ve maturasyonunu etkileyeceğinden ak madde hasarına neden olmaktadır. Bakteriyel enfeksiyon ve sistemik inflamasyonu taklit etmek için sistemik veya bölgesel olarak enjekte edilen LPS ile birçok deneysel çalışma yapılmıştır. 1970'lerde Gilles ve arkadaşları anneye intraperitoneal (İP) enjekte edilen LPS'nin, yavrularda preterm bebeklerdekine benzer ak madde hasarı yaptığını saptamıştır (74). Benzer bir model köpeklerde ve maymunlarda

oluşturulduğunda, ak madde hasarının bu hayvanlarda da olduğu gözlenmiştir (75,252,253).

Tavşan fetüslerinde intrauterin LPS enjeksiyonu yerine *E. Coli* ile enfeksiyon oluşturulduğunda, LPS ile benzer şekilde ak madde hasarının olduğu saptanmıştır (254). Daha sonraki yıllarda sıçanlar ve farelerle yapılan intrauterin ve yenidoğan çalışmalarında oluşan beyin hasarının diğer modellerle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (76,255). Koyunlarda intrauterin LPS enjeksiyonu ile yapılan çalışmalarda, oluşan inflamasyona bağlı olarak periventriküler ak maddede fokal inflamatuvar birikimler ve kistik lezyonlar, mikroglial aktivasyon, astrosit hasarı ve oligodendrositlerin azaldığı gözlemlenmiştir (34,256). Nitsos ve arkadaşlarının 28 gün boyunca intraamniyotik LPS infüzyonu ile oluşturduğu kronik koryoamniyotik modelinde, intraamniyotik IL-6 ve IL-8 seviyelerinin arttığı, beyinde makrofaj infiltrasyonunun olduğu, aksonal hasar ve ak maddede oligodendrosit öncüllerinin azaldığı saptanmıştır (257). Bu model hipoksi ve hipotansiyon gibi ek faktörler olmasa da inflamasyonun doğrudan beyin hasarına yol açabildiğini göstermiştir. Son zamanlarda LPS'nin sadece sistemik inflamatuvar yanıt ile değil, aynı zamanda TLR gibi özgün hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak MSS'de doğal bağışıklığı aktive edebildiği ve hasara yol açabildiği gösterilmiştir (258,259).

Hayvanlarda intrauterin enfeksiyon/inflamasyonu taklit etmek için değişik modeller oluşturulmuştur. Bu modellerde inflamatuvar ajan olarak genellikle LPS kullanılmıştır. Ancak uygulama yeri, şekli ve dozlarında büyük farklılıklar vardır. Fetüse hiç dokunmadan maternal LPS enjeksiyonu yapıldığı gibi, doğrudan beyin içine uygulayan modeller vardır.

2.4.a. İntraserebral LPS uygulanması

Bu modelde LPS çalışmacılar tarafından ya doğrudan subkortikal ak madde içine yada intrasisternal olarak uygulanmıştır (207,260-262). LPS'nin doğrudan ak madde içine uygulandığı çalışmalarda beyin dokusunda IL-6, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde ani ve hızlı yükselmeler saptanmıştır. Ak maddede, IL-1 β ve İNOS üretiminin mikroglia/makrofaj kaynaklı olduğu görülmüştür. İnflamatuvar cevap sonrasında ise oligodendrosit öncüllerinde

azalma, myelinizasyon kaybı, astrogliazis ve bilateral ventriküllerde genişleme tespit edilmiştir (207,261). Ak maddedeki bu değişikliklere rağmen gri maddede herhangi bir hasar gözlenmemiştir (207). Sitokinlere cevabı ve beyin hasarı arası ilişkiyi araştıran bir çalışmada IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) verilen deneklerde ak madde hasarının azaldığı ancak anti-TNF- α verilenlerde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (262). İntrasisternal LPS uygulaması yapılan çalışmalarda TNF- α düzeylerinde yükselme dışında sitokin düzeylerinde değişiklik ve beyin hasarı saptanmamıştır (260).

2.4.b.Fetüse intravenöz LPS uygulanması

Koyunlarda yapılan bu modelde LPS, gestasyonun ortasında intravenöz olarak fetüse uygulanmış ve preterm bebeklerdekine benzer şekilde karakteristik ak madde lezyonlarına neden olduğu saptanmıştır (34,256,263,264). Nöropatolojik hasarın periventriküler ve subkortikal ak maddede fokal kistik lezyonlardan inflamatuvar birikimler, reaktif gliozis ve immatür oligodendrositlerde azalma ile birlikte olan yaygın ak madde hasarına kadar değişiklik göstermekte olduğu tespit edilmiştir. İntraserebral LPS modeline benzer şekilde, ağır ak madde ve bazal gangliyon nekrozları olsa bile kortikal gri maddede herhangi bir hasar saptanmamıştır. Bu çalışmalarda serebral sitokin düzeyleri çalışılmamıştır ancak fetal plazma TNF- α ve IL-6 düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir (263,265). Amniyon sıvısı sitokin düzeyleri ise normal bulunmuştur.

2.4.c.İntrauterin LPS uygulanması

Değişik hayvanlarda yapılan, intrauterin LPS uygulaması (intraservikal, intra-amniyon/koryon) ile oluşturulan intrauterin enfeksiyon/inflamasyon modeli ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (28,33,266-269). Uygulama şekli, uygulanan LPS dozu ve hayvan cinsleri değişse de çalışmalarda elde edilen fetal ve maternal sitokin cevabı benzerlik göstermektedir. Plasentada, IL-1, IL-6, TNF- α mRNA düzeylerinin LPS'den 6 saat sonra arttığı saptanmıştır (28,33,266). İntraamniyotik LPS sonrası beşinci saatte amniyon sıvısında ve fetal kandaki inflamatuvar hücre sayısı ile

birlikte koryoamniyon IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α mRNA seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir (267). Yakın dönemde yapılan bir çalışmada Elovitz ve arkadaşları farelere intrauterin LPS uygulaması ile oluşturdukları preterm doğum ve inflamasyon modelinde inceledikleri sitokin salınımı ile ilişkili 16 T lenfosit geninden 15'inin fetal beyinde upregülasyona uğradığını tespit etmişlerdir (33). Ancak plasentadaki sitokin cevabı ile fetal beyindeki inflamatuvar cevabın her zaman birbiri ile tam ilişki içinde olmadığı da saptanmıştır. Değişik çalışmalar intrauterin LPS uygulamasının beyinde hipomiyelinizasyona yol açtığını göstermiştir. Fetal dönemde 15. günde (E15) LPS uygulanan farelerde beyinde 6. saatte myelin proteinlerinin (proteolipit protein) üretiminin düştüğü, potnatal 21. güne kadar takip edilen sıçanlarda ise immatür oligodendrosit belirteçlerinin ve proteolipit protein seviyelerinin korpus kallozumda azaldığı tespit edilmiştir (33,268,269). Beyin hasarını gösteren bu bulgulara rağmen motor hasar veya bilişsel yetersizlik her zaman gözlenmemiştir (268).

2.4.d. Maternal LPS uygulaması

Maternal İP LPS uygulaması ile annede oluşturulan sistemik inflamasyonun fetal inflamatuvar cevaba yol açması ile ilgili hayvan çalışmaları özellikle son 10 yıldır çok artmıştır. Farelerde gestasyon ortasında uygulanan LPS'nin doza bağımlı şekilde fetüs ölümlerine yol açabildiği bildirilmiştir (270). Ayrıca hamileliğin çok erken safhasında uygulanan LPS'nin blastokist implantasyonunu engellediği gösterilmiştir (271). Anneye İP olarak uygulanan LPS'nin yüksek dozlarda fetüse geçebildiği ve inflamasyonu şiddetlendirdiği saptanmıştır (272). Ancak LPS'nin fetüse geçmesi de inflamatuvar cevaba neden olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda, İP olarak uygulanan LPS sonrası anne kanında, plasentada, amniyotik sıvı koryoamniyotik zarlarda IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-10 seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir (157,158,273,274). LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra fetüs beyinde IL-1 β mRNA düzeylerinin arttığı ve 48-72 saat süre ile belirgin seviyede yüksek kaldığı gösterilmiştir (168,208,262). Farelerde benzer şekilde anneye İP olarak enjekte edilen LPS'nin MCP-1, IL-6, IL-1 β ve vasküler endotelial growth faktörde (VEGF) upregülasyona neden olduğu, aksonal uzama ve nörogenez ile ilgili genlerde

downregülasyona yol açtığı saptanmıştır (30). Ancak beyinde TNF- α mRNA düzeyi ile ilgili yayınlar çelişkilidir. Bazı araştırmacılar TNF- α 'nın fetüs beyinde 24. saatte yükseldiğini gösterirken, bazı çalışmalarda ise TNF- α düzeylerinde değişiklik gözlenmemiştir (168,208,262,274). Proinflamatuvar ajanlara karşı oluşan bu farklı bulgularda sitokin uyarısı ile salgılanan antiinflamatuvar (IL-10) ve nörotrofik (NGF,BDNF) faktörlerin rolünün olabileceği düşünülmektedir (275,276). Sıçanlarda İP olarak anneye enjekte edilen LPS'nin neonatal Sıçan beyinde IL-1, TNF- α 'nın upregülasyonuna ayrıca BDNF ve NGF nin salgılanmasına neden olduğu saptanmıştır (29,168,269,274,275). Ortaya çıkan fetal inflamatuvar cevapla uyumlu olarak anneye uygulanan LPS'nin ak maddede hipomyelinizasyona ve astrogliozise yol açtığı gösterilmiştir (168,208,262). Ayrıca LPS uygulanmasından 2-9 gün sonra hem gri hem de ak maddede mikroglial aktivasyon ve oligodendrosit öncüllerinde apoptoz ortaya çıkmıştır (168,208). Bu bulguların bir yansıması olarak, annesine hamilelikte LPS enjekte edilen farelerin erişkin döneminde uzun süreli hafıza değişiklikleri ve davranış farklılıkları olduğu gözlenmiştir (276,277).

2.4.e.Antiinflamatuvar tedavi

Hem hipoksi-iskemi hem de enfeksiyonlar immatür beyinde nöroinflamatuvar cevabı tetikler. İnflamatuvar kaskadı inhibe edecek tedaviler oluşacak beyin hasarını azaltmaya yardımcı olabilmektedir. Örneğin intraserebral LPS enjeksiyonu sonrası uygulanan mikroglia aktivasyonunun bir inhibitörü olan minosiklinin beyindeki inflamasyonu ve hasarı azalttığı saptanmıştır (278). İnflamasyon ve hipoksi-iskemi ile ilgili deneysel modellerde birçok antiinflamatuvar ve antioksidan molekülün hasarı azaltıcı veya iyileştirici etkinliği araştırılmıştır.

2.4.e.1.Melatonin

Bünyesinde barındırdığı antioksidan, antiinflamatuvar ve antioksidotoksik özellikler melatonini prelinik çalışmalarda tedavi edici molekül olarak ideal bir aday yapmaktadır (35). Ayrıca melatoninin yenidoğan bebeklerde kullanıldığında herhangi bir probleme yol açmadığının

gösterilmesi, klinik çalışmalarda kullanılmaya aday hale getirmiştir. Birçok deneysel çalışmada profilaktik veya tedavi için verilen melatoninin etkili bir nöroprotektif ajan olduğu gösterilmiştir. Melatonin antioksidan olarak süperoksit anyonları ortadan kaldırırken aynı zamanda antioksidan enzim sentezini de artırmaktadır. Çalışmaların çoğunda melatoninin kemirgenlerde oluşturulan beyin travması veya fokal iskemi üzerine etkisi analiz edilmiştir (36-40). Bu modellerde melatoninin oluşan hasarlı bölge boyutu, nöron ölümü, oksidatif stres, mitokondriyal etkilenme ve DNA hasarını azalttığı, nörolojik gelişim ve davranış üzerine olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (39,40,279). Koyunlarda preterm beyin hasarının taklit edildiği umbilikal kord oklüzyon modelinde, intravenöz melatonin uygulanmasının mikrogial aktivasyon ve apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (280). Ayrıca yetişkin endojen melatonin üretemeyen farelerde hipoksi-iskemiye bağlı hasarın daha geniş olduğu saptanmıştır (281). Ancak yenidoğan hayvanlarda ve insanda endojen melatonin üretiminin çok az olması ve melatonin reseptör antagonisti (luzindol) verilen sıçan fetüslerinde hasara yönelik herhangi bir etkisinin görülmemesi, endojen melatonin üretiminin yenidoğan beynini korumakta yeterli olmadığını göstermiştir (35). Farelerde yapılan bir çalışmada melatoninin eksitotoksik ak madde hasarını değiştirmede fakat aksonal büyümeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (35). Ancak melatonin tedavisinin inflamasyona bağlı oluşan ak madde hasarına ve myelinizasyona olan etkileri halen iyi bilinmemektedir. Perinatal beyin hasarını inceleyen hayvan modellerinde melatoninin immün reaksiyonu düzenleyerek antiinflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (282). Bu etkilerini hem doğrudan etkileyerek hem de reseptör aracılığı ile gerçekleştirmektedir (35). İki tip melatonin reseptörü vardır: MT1 ve MT2. Her iki reseptör de ak maddede bulunan tüm hücrelerde (mikroglia, astrosit, oligodendrosit) eksprese edilmektedir. Oliver ve arkadaşlarının yakın dönemde sıçan fetüslerinde yaptığı bir çalışmada melatonin verilen LPS ile uyarılmış sıçanlarda cingulat girusta mikrogial aktivetinin ve immatür oligodendrosit hasarının azaldığı ve oligodendrosit maturasyonunun arttığı tespit edilmiştir (35). Melatoninin serbest oksijen radikallerinin azalmasını, membran geçirgenliğinin

düzenlenmesini, nötrofil göçünün azaltılması, NF- κ B aktivasyonunu engelleyip proinflamatuvar sitokin salınımının azaltılmasını sağlayarak immün reaksiyonları düzenlediği gösterilmiştir (283-287). Ayrıca melatonin astrositlerdeki antioksidan savunmayı güçlendirerek astrositleri oluşacak hasarlara karşı korumaktadır (288,289).

2.4.e.2.Etanersept (TNF- α reseptör antagonisti)

Etanersept, antiinflamatuvar bir molekül olarak tedaviye dirençli romatoid artrit ve psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde erişkinlerde başarı ile kullanılmaktadır. Ancak literatürde etanerseptin intrauterin inflamasyon ve perinatal beyin hasarına etkisine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. TNF- α 'nın proinflamatuvar sitokin olarak intrauterin dönemde inflamasyonu başlatma ve artırma gibi olumsuz etkilerinin olması etanerseptin potansiyel olarak oluşabilecek ak madde hasarına karşı koruyucu olabileceğini akla getirmektedir. Aden ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, etanerseptin beyin hasarını %50 azalttığı gösterilmiştir (290). Travmatik beyin hasarını etkisini inceleyen bir başka çalışmada ise etanerseptin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerini beyin dokusunda azalttığı gösterilmiştir (291). Ancak intrauterin inflamasyonda TNF- α 'nın aynı zamanda bazı koruyucu sistemleri aktive etmesi ve immatür beyin gelişiminde TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin önemli fonksiyonu etanerseptin olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız prospektif, plasebo kontrollü deneysel araştırma olarak yapıldı. Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alınan bu çalışma, Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dokuda sitokin incelemeleri Yeditepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi.

3.1. Deney hayvanları ve deney protokolü

Çalışmada kullanılan sıçanlar Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarının hayvan yetiştirme ünitesinde “outbred” yöntemi ile elde edildiler. Çalışmada gebeliği planlanmış ve gebelik günü belirlenmiş olan Spraque-Dawley türü sıçanlar kullanıldı. Hamilelik oluşturmak için sıçanlar 2 dişi, 1 erkek olacak şekilde 3'er sıçanlık gruplar halinde 3-5 gün süre ile aynı kafeslerde tutuldu. Hamilelik başlangıcını belirlemek için günlük vajinal smear alındı ve sperm araştırması yapıldı. Sperm tespit edilen gün 0. gün kabul edildi. Sperm tespit edilen dişi sıçan kafesten ayrıldı. Sıçanlar, 20-25 °C ısı, %50 nem, 12 saat karanlık ve 12 saat fotoperiyotta, standart besin ve su ile beslendi. Hamile olan sıçanlar 5 gruba ayrılıp, her grubun kafesleri ayrıldı. Prosedürlere bağlı anne ve fetüs kayıpları göz önünde bulundurularak her grupta dörder adet gebe sıçan bulundurulmasına karar verildi. Grup 1'de bulunan sıçanlar kontrol, grup 2'de olanlar pozitif kontrol, grup 3'de olanlar melatonin, grup'4 de olanlar etanersept, grup 5'de olanlar ise melatonin+etanersept grubu olarak belirlendi. Gebelik günü 15. gün (E15) olan gebe sıçanların cerrahi prosedür ile uterusları açığa çıkarıldı. Kontrol grubuna 0.1 ml steril serum fizyolojik (SF), diğer gruplara 0.1 ml SF içinde LPS intrauterin olarak uygulandı. Cerrahi prosedür sonrası ayrı kafeslerde derlenmeye alınan gebe sıçanlar standart besin ve su ile beslendi ve sakrifikasyona kadar gruplarına göre ilaç uygulamaları yapıldı. E20'de anestezi altında fetal beyin dokusu örnekleri incelenmek üzere alındı.

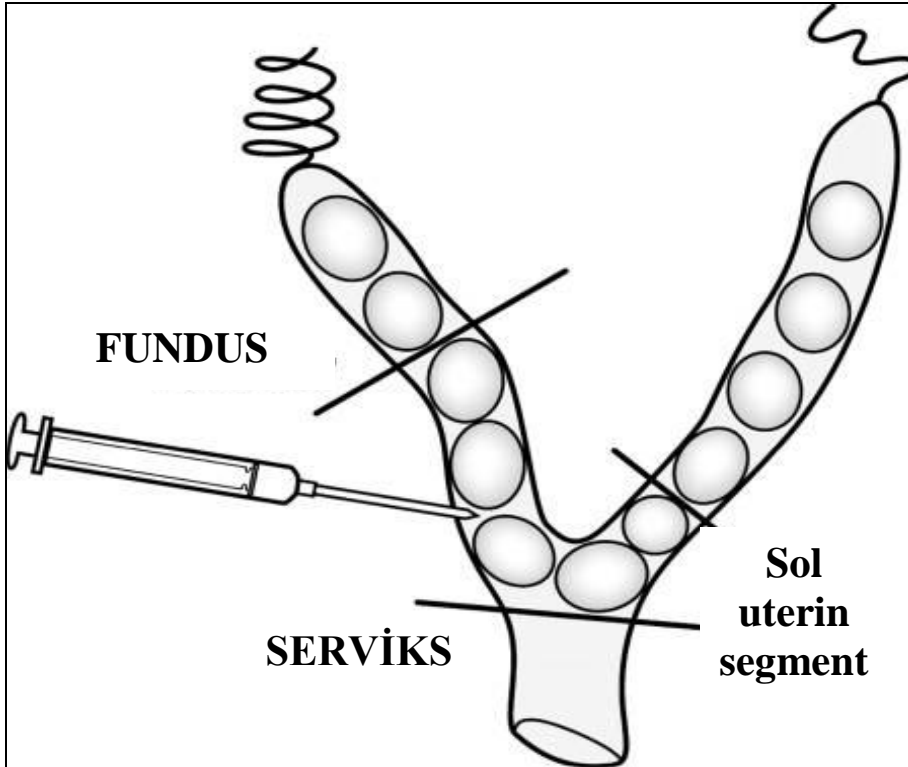
Çalışmaya alınan sıçanların tümü çalışma bitiminde anestezi altında iken dekapitasyonla sakrifiye edildi.

3.2. Deney prosedürleri ve grupları

3.2.a. Cerrahi prosedürler

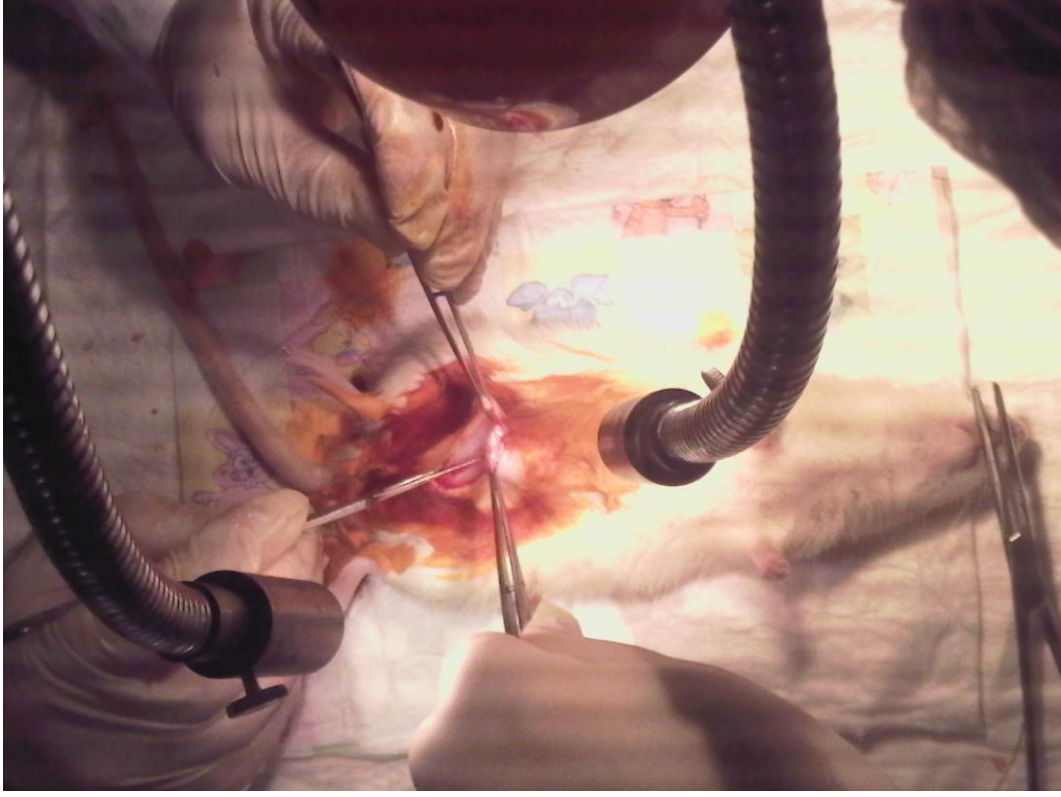
Tüm gruplardaki sıçanlara cerrahi olarak aynı prosedürler uygulandı. Gebelik günü belirlenmiş sıçanlarda E15'de intramüsküler katı anestetikle (ketamin 80mg/kg, ksilazin 10mg/kg) derin anestezi sağlandı. Daha önce literatürde belirtilen ve farelerde intrauterin LPS enjeksiyonu ile oluşturulan intrauterin inflamasyon modeli bu çalışmada uygulandı (292). Bu modelde, derin anestezi altındaki gebe sıçanlar operasyon masasına alındıktan sonra, batin orta hatta 1-1,5 cm'lik kesi ile uterus açığa çıkarıldı (Resim 1 A,B). Batin içi organlar steril SF ile ıslatılarak kurumaları önlendi. Sağ uterin horn alt uç 1. ve 2. amniyotik kesecikler arasından koryonik ve amniyotik membranlar arasına LPS enjekte edildikten sonra batin SF ile yıkanıp, primer kapatma yapıldı (şekil 12), (Resim 1 C,D). Sıçanlar, ayrı kafeslerde 5 gün daha takip edildikten sonra E20'de deney sonlandırıldı.

Şekil 12: LPS enjeksiyonunun temsili şekli (293).

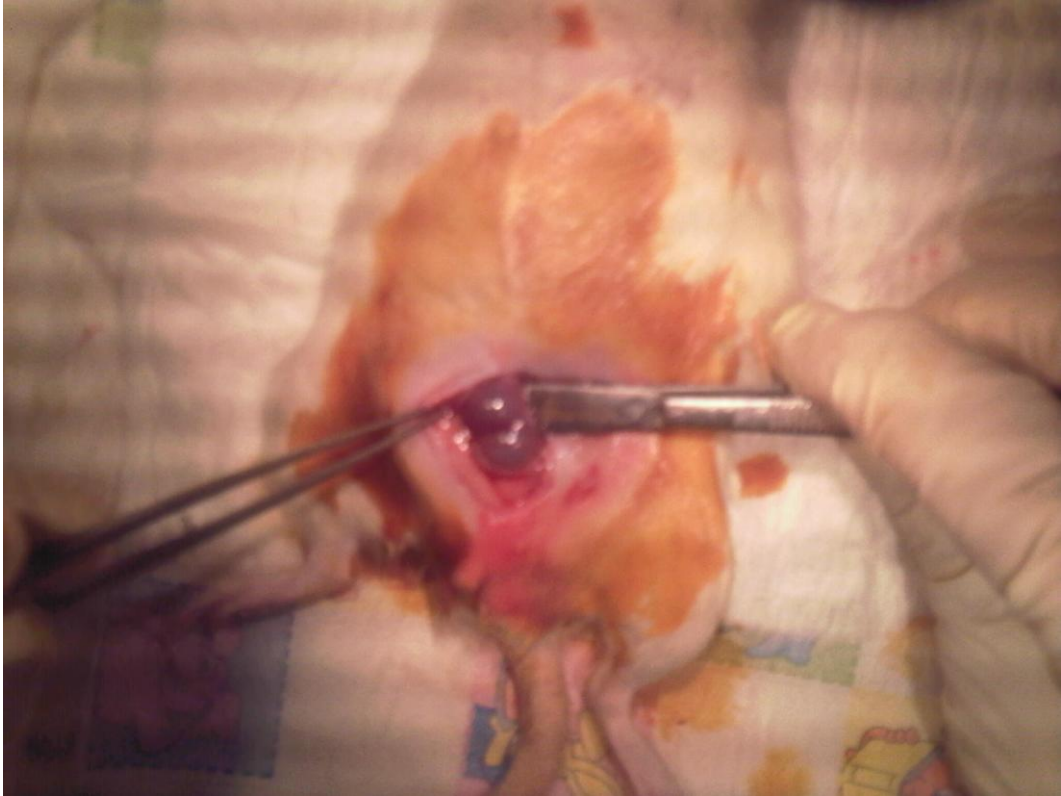


Resim 1: Cerrahi prosedür

A. Batının minimal kesi ile açılması



B. Uterusun açığa çıkarılması



C. Sağ uterin horn 1.ve 2. keseler arasına enjeksiyonun yapılması



D. Batının kapatılması



3.2.b. İlaçların uygulanması

E. coli 055:B5 (Sigma, ABD) serotipinden fenol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş LPS'ler kullanıldı. Tüm LPS'ler aseptik koşullarda, 2 mg/ml konsantrasyonda sulandırıldılar ve kullanılabildiği kadar -70°C de saklandılar. Sonraki dilüsyonlar steril aseptik serum fizyolojik ile yapıldı. LPS dozu, literatürde daha önce sıçanlarda intrauterin inflamasyon modeli oluşturmak için uygulanan, anne ve fetüs kaybının en az olduğu gözlenen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlenmiştir (294). Üretici firmanın önerisine uygun olarak steril SF ile sulandırılan LPS, 0.1 ml SF içinde, 125 mcgr/sıçan dozunda, tek doz ve intrauterin olarak uygulandı. Kontrol grubuna, LPS yerine 0.1 ml steril SF intrauterin olarak enjekte edildi.

Melatonin (Sigma, ABD), etil alkol içinde çözündürüldükten sonra uygulanacak dozlara göre bölünüp, enjeksiyon zamanına kadar -20 °C'de dondurularak saklandı. Uygulama öncesi dilüsyonları 1'e 9 oranında (1 ml melatonin, 9 ml SF) steril SF ile yapıldı. Melatonin, LPS enjeksiyonundan hemen sonra ve sonraki 4 gün boyunca günde tek doz olmak üzere toplam 5 doz ve 20mg/kg dozunda subkutan uygulandı.

Etanersept (Enbrel,Wyett, A.B.D.) liyofilize flakonlar şeklinde temin edildi. Flakonlar, uygulama öncesi firma tarafından temin edilen hazır çözücü solüsyonlar ile sulandırılarak kullanıldı. Etanersept LPS sonrası ve E18'de 2mg/kg/dozundan toplam 2 doz olarak subkutan yol ile uygulandı (295).

3.2.c. Çalışma grupları ve ilaç uygulama protokolü

Deney grubundaki sıçanlar 5 gruba ayrıldı (şekil 12).

Grup 1 Kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara E15'de cerrahi prosedür uygulanarak intrauterin 0.1 ml SF enjekte edildi ve sakrifikasyona kadar ayrı kafeslere alındı.

Grup 2 Pozitif kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara E15'de cerrahi prosedür uygulanarak intrauterin 0.1 ml SF içinde 125 mcgr LPS enjekte edildi ve sakrifikasyona kadar ayrı kafeslere alındı.

Grup 3 Melatonin grubu: Bu gruptaki sıçanlara E15'de cerrahi prosedür uygulanarak intrauterin 0.1 ml SF içinde 125 mcgr LPS enjekte edildi.

Melatoninin ilk dozu LPS enjeksiyonundan hemen sonra yapıldı. Melatonin günde bir kez olacak şekilde 5 gün boyunca toplam 5 doz uygulandı.

Grup 4 Etanersept grubu: Bu gruptaki sıçanlara E15'de cerrahi prosedür uygulanarak intrauterin 0.1 ml SF içinde 125 mcgr LPS enjekte edildi. Etanerseptin ilk dozu LPS enjeksiyonundan hemen sonra yapıldı. Etanerseptin 2. dozu E18'de uygulandı.

Grup 5 Melatonin+Etanersept grubu: Bu gruptaki sıçanlara E15'de cerrahi prosedür uygulanarak intrauterin 0.1 ml SF içinde 125 mcgr LPS enjekte edildi. Melatoninin ve etanerseptin ilk dozu LPS enjeksiyonundan hemen sonra subkutan olarak yapıldı. Melatonin, grup 3'de olduğu gibi günde tek doz toplam 5 doz uygulandı. Etanerseptin 2. dozu E18'de uygulandı.

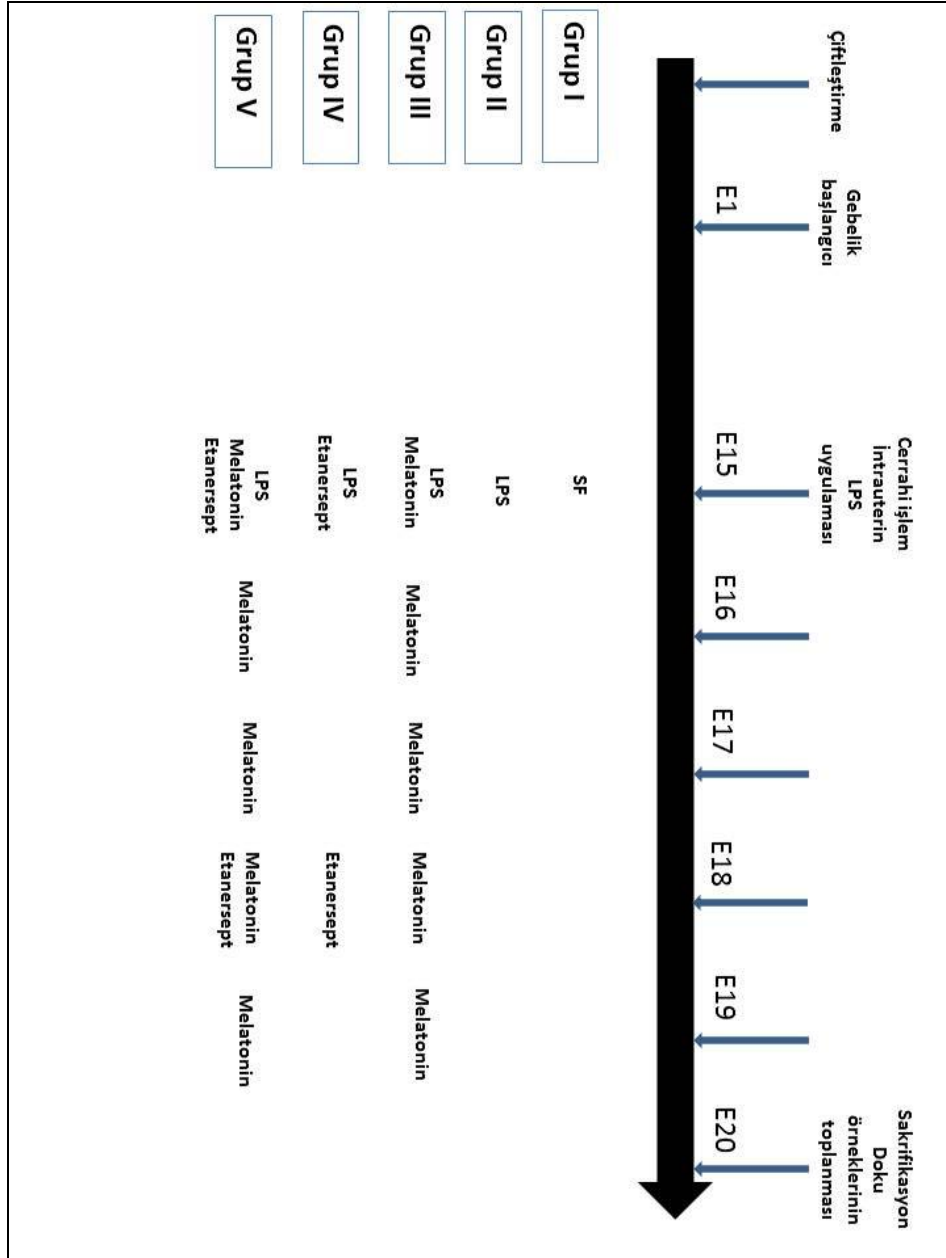
3.3. Doku hazırlığı ve sitokin analizi

Tüm gruplardaki gebe sıçanlar E20 de katı anestetik ile derin anestezisyne sokuldu. Canlı fetüsler dekapite edilerek beyin dokuları ayrıldı ve - 80 °C'de doku örnekleri donduruldu. Doku homojenizasyonu için çözdürülen dokularda proteaz inhibitör kokteyli (Complete Mini, EDTA-free-Roche) içeren, pH'sı 7.2 olan 1xfosfat tampon çözelti (Phosphate Buffered Saline(PBS)) kullanıldı. Her fetüs beyni 1ml solüsyon içinde manuel homojenizatör ile 2 dakika homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar +4 °C'de 15 dakika 12,000Xg'de santrifüj edildi. Supernatantlar ayrılıp -80 C de dondurularak bekletildi. Sitokin analizi için, dondurulmuş serumlar -80 °C'den alınarak +4 °C'de çözülmeye bırakıldı. Supernatantların total protein içeriğini belirlemek için Bradford yöntemi kullanıldı. Daha sonra supernatantlardan TNF-a, IL-1 β , IL-6, IFN- γ sitokin düzeylerinin ölçümü için Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (BenderMedSystem's, Avusturya) yöntemi uygulandı. Her sitokin için belirlenen standart grafiklerden yararlanılarak konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplandı. Elde edilen sitokin düzeyleri doku homojenizatındaki total protein miktarına oranlanarak sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.

3.4. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 16.0 (Statistical packages for social sciences, Chicago, IL) programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığı yansıtan değer olarak p değeri <0.05 olarak seçildi. Deney grupları sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılarak hesaplandı. Çalışmamızda gruplar arası sitokin düzeylerini karşılaştırmada Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Grupların ikili karşılaştırmalarında Mann-Whitney U analizi yapıldı.

Şekil 13: Çalışmanın şematik olarak özeti.



4. BULGULAR ve SONUÇLAR

Tüm sıçanlar term gebelik süresi kabul edilen 21-22. günden önce sakrifiye edilerek, 20. günde fetüs beyin dokusu örnekleri alınmıştır. Gebe sıçanların LPS uygulaması yapılmadan önce bakılan vücut ağırlıkları 245-310 gr arasında değişmekteydi ve gruplar arasında belirgin bir fark yoktu (Tablo 2).

Tablo 2: Gebe sıçanların ortalama ağırlıkları

	Ortalama (gr) ±SD	Minimum(gr)	Maksimum(gr)
Kontrol	272±22	245	305
Melatonin+Etanersept	260±28	247	299
Melatonin	275±25	245	310
Etanersept	265±12	249	282
Pozitif kontrol	273±18	247	302

4.1. Sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi

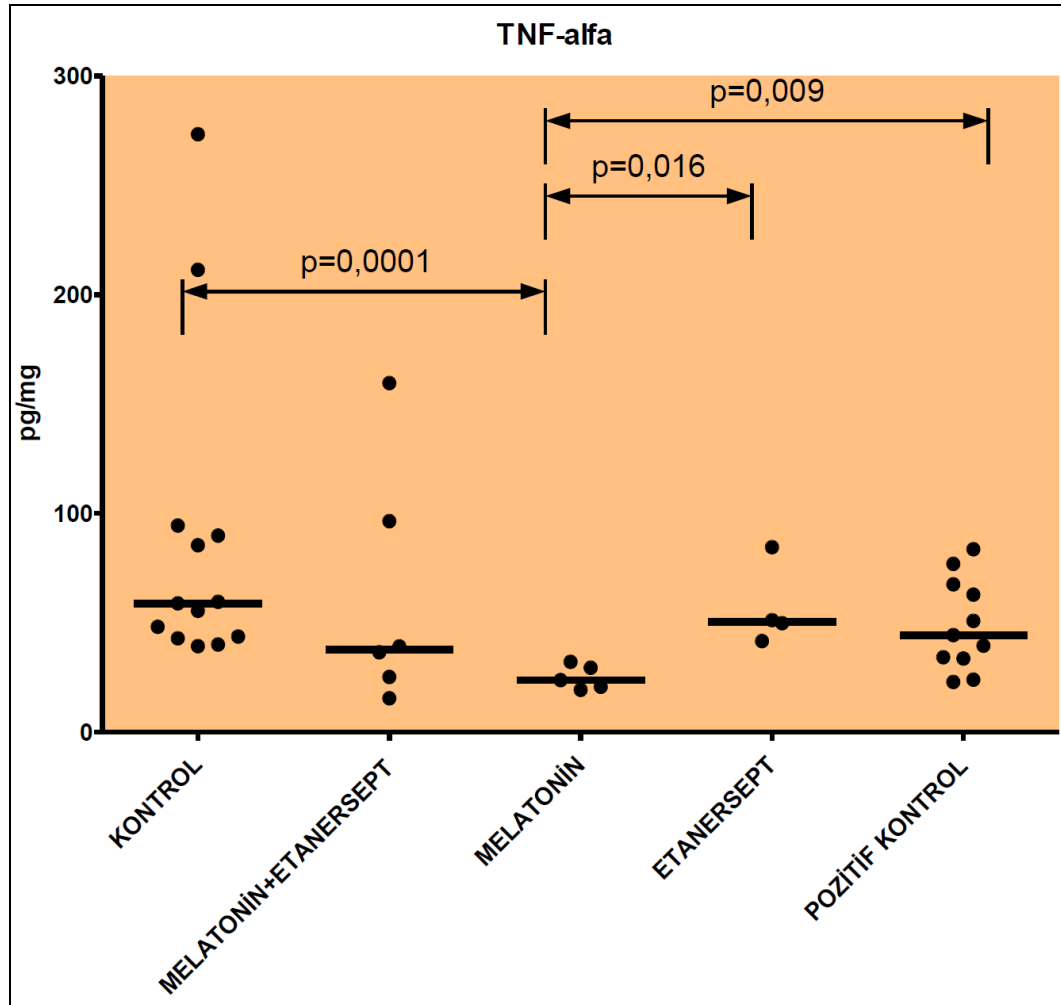
4.1.a. TNF- α

TNF- α düzeyleri, kontrol grubunda, pozitif kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. En düşük TNF- α düzeyi melatonin grubundaydı. TNF- α düzeyinin gruplar arası dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0,01$). Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, bu farkın melatoninden kaynaklandığı ve melatonin grubunun TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna, etanersept grubuna ve pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ortalama TNF- α düzeyleri ve istatistik sonuçları Tablo 3 ve Şekil 14'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Grupların ortalama TNF- α düzeyleri

	Ortalama (pg/mg) \pm SD	Minimum (pg/mg)	Maksimum (pg/mg)
Kontrol	87,91 \pm 72,23	39,3	273,4
Melatonin+Etanersept	62,1 \pm 55,49	15,5	159,6
Melatonin	25,12 \pm 5,6	19,4	32,2
Etanersept	56,8 \pm 19,01	41,6	84,6
Pozitif kontrol	49,17 \pm 20,95	22,9	83,7

Şekil 14: Grupların TNF- α ortanca değerleri ve istatistik sonuçları



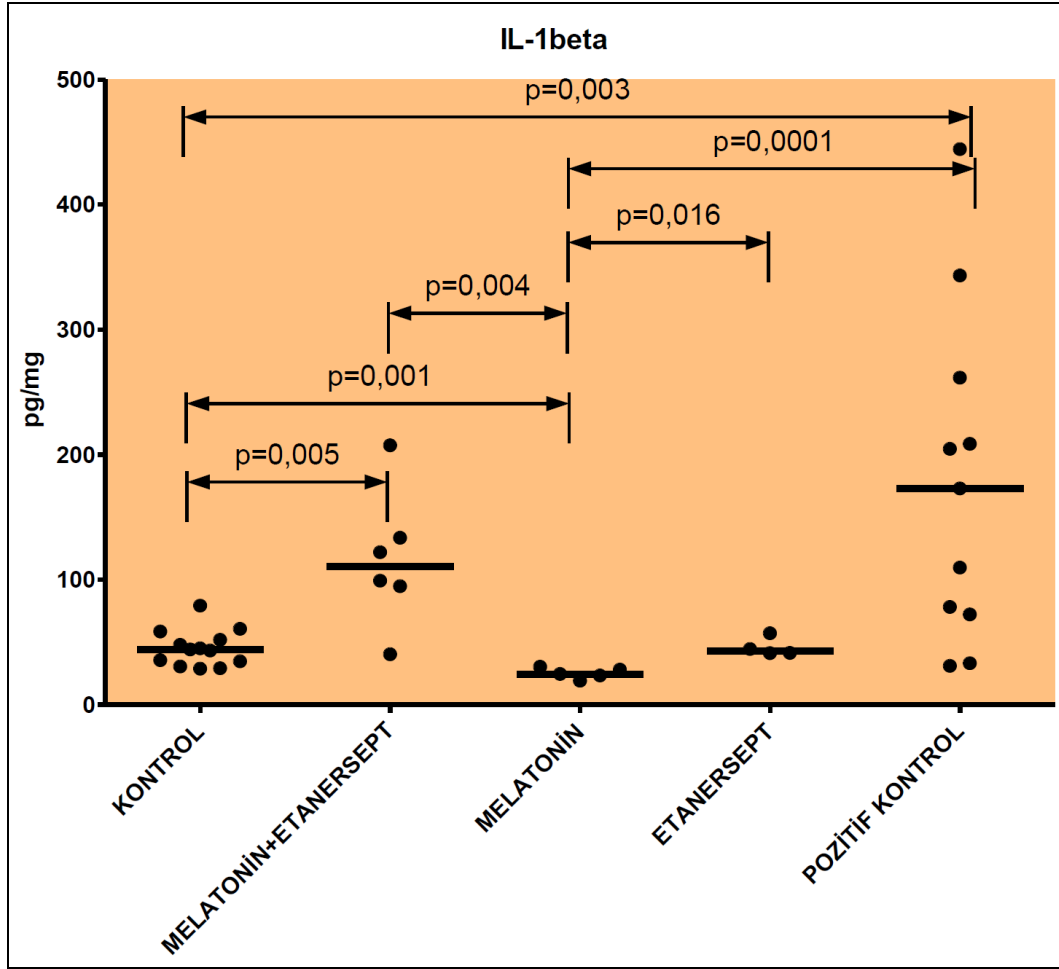
4.1.b. IL-1 β

IL-1 β düzeyleri pozitif kontrol grubunda diğer gruplara göre belirgin derecede yüksek bulundu. En düşük IL-1 β düzeyi melatonin grubundaydı. Etanersept grubu kontrol grubu ile aynı seviyelerde bulunmasına rağmen, melatonin + etanersept grubu kontrol ve etanersept grubuna göre belirgin derecede yüksekti. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı fark olduğu (p=002), IL-1 β düzeyinin melatonin grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede düşük olduğu saptandı. Etanersept grubu, pozitif kontrole göre belirgin şekilde düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.078). Ortalama IL-1 β düzeyleri ve istatistik sonuçları Tablo 4 ve Şekil 15’da gösterilmiştir.

Tablo 4: Grupların ortalama IL-1 β düzeyleri

	Ortalama (pg/mg) \pmSD	Minimum (pg/mg)	Maksimum (pg/mg)
Kontrol	45,35 \pm 14,64	28,8	79,2
Melatonin+Etanersept	116,2 \pm 55,04	40,4	207,4
Melatonin	25,12 \pm 4,3	19,2	30,3
Etanersept	46,07 \pm 7,51	41,2	57,1
Pozitif kontrol	178,13 \pm 132,37	31,1	444,3

Şekil 15: Grupların IL-1 β ortanca değerleri ve istatistik sonuçları



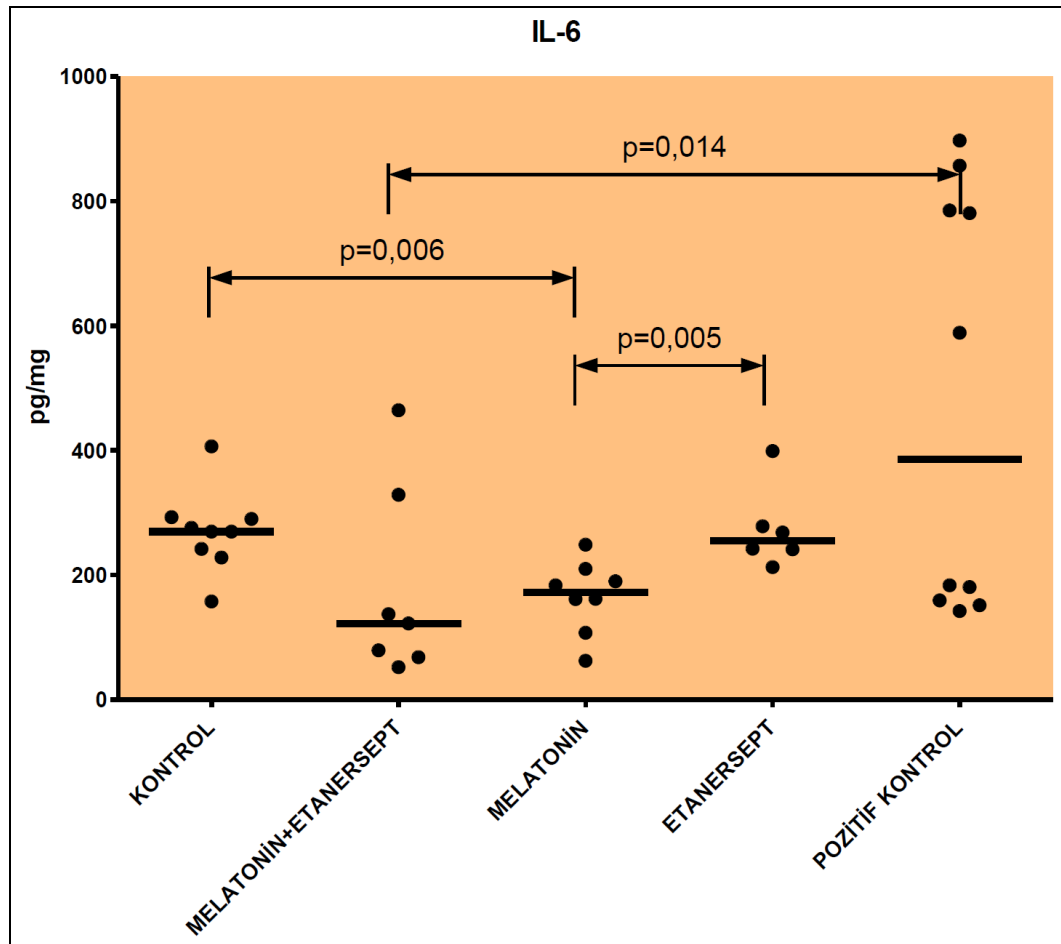
4.1.c. IL-6

IL-6 düzeyleri, pozitif kontrol grubunda daha yüksek saptandı. Ortalama değerlerine bakıldığında, en düşük IL-6 düzeyi melatonin grubundaydı. Ancak istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0,11$). Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında melatonin grubunun kontrol grubuna göre, melatonin grubunun etanersept grubuna göre ve etanersept+melatonin grubunun pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptandı. Ortalama IL-6 düzeyleri ve istatistik sonuçları Tablo 5 ve Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tablo 5: Grupların ortalama IL-6 düzeyleri

	Ortalama (pg/mg) \pm SD	Minimum (pg/mg)	Maksimum (pg/mg)
Kontrol	269,85 \pm 65,94	157,2	406,1
Melatonin+Etanersept	178,57 \pm 156,68	51,7	464,1
Melatonin	165,41 \pm 58,38	62,2	248,6
Etanersept	273,34 \pm 65,61	212,4	398,8
Pozitif kontrol	438,61 \pm 370,4	75,5	896,9

Şekil 16: Grupların IL-6 ortanca değerleri ve istatistik sonuçları



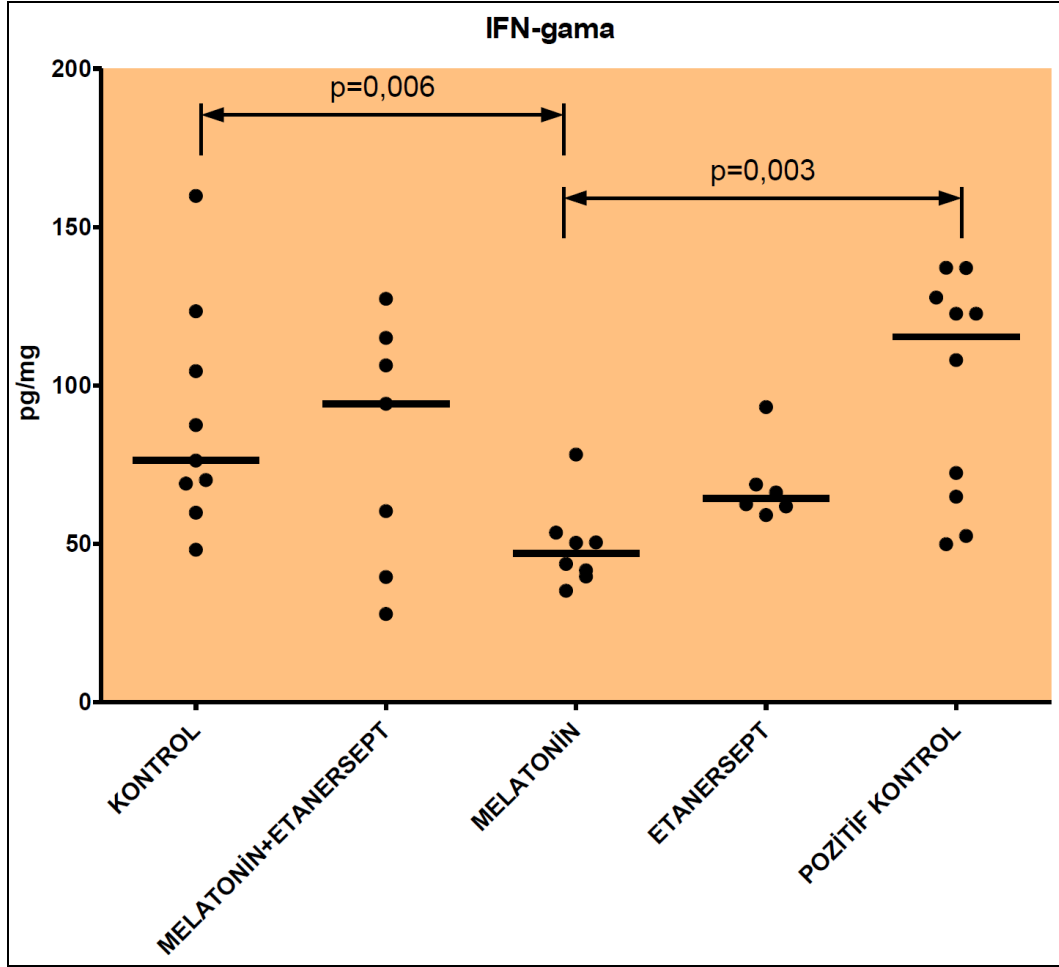
4.1.d. IFN- γ

Ortalama IFN- γ düzeyi, melatonin grubunda diğer gruplara göre belirgin derecede düşüktü. IFN- γ düzeyi en yüksek pozitif kontrol grubunda saptandı. İstatistiksel analizlerde IFN- γ düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu saptandı (p=0.018). İkili karşılaştırmalarda melatonin grubunun hem kontrol hem de pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Ortalama IFN- γ düzeyleri ve istatistik sonuçları Tablo 6 ve Şekil 20'de gösterilmiştir.

Tablo 6: Grupların ortalama IFN- γ düzeyleri

	Ortalama (pg/mg) \pmSD	Minimum (pg/mg)	Maksimum (pg/mg)
Kontrol	88,67 \pm 35,16	48,07	159,78
Melatonin+Etanersept	81,45 \pm 38,94	27,76	127,30
Melatonin	48,99 \pm 13,29	35,14	78,12
Etanersept	68,51 \pm 12,52	59,01	93,11
Pozitif kontrol	99,43 \pm 35,56	49,84	137,09

Şekil 17: Grupların IFN- γ ortanca değerleri ve istatistik sonuçları



5. TARTIŞMA

Antenatal inflamasyonun fetüste beyin hasarına yol açabileceği ve proinflamatuvar sitokinler gibi aracı moleküllerin bu hasarın oluşmasında önemli pay sahibi oldukları anlaşılmıştır. İntrauterin enfeksiyonlar, inflamatuvar hücreleri uterin boşluğa çeken ve feto-maternal üniteye inflamasyonu tetikleyen en önemli etkidir. Bunun sonucunda ortaya çıkan maternal ve fetal immün cevap ise değişik organ hasarlarına yol açan olaylara sebep olmaktadır (17-22).

İntrauterin inflamasyon nedeni ile oluşan beyin hasarı kendini daha çok ak madde hasarı olarak göstermektedir. Bu durumun klinik yansıması ise bilişsel ve akademik performanstaki düşüklükten serebral palsiye kadar değişebilmektedir (17,18,21,22,25). Annedeki ve uterin boşluktaki inflamasyonun fetüs beynine iletilmesindeki araçlar ve beyin hasarının oluşmasındaki moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak proinflamatuvar sitokinlerin -özellikle TNF- α , IL-1 β , IL-6- uterin boşluktaki inflamasyonun iletilmesi ve hasarın ortaya çıkması açısından önemli oldukları gösterilmiştir (28,29,31,33). Son bulgular fetüste beyin hasarı oluşumu için glial aktivasyonun önemli bir basamak olduğunu göstermiştir. Aktive olmuş mikroglia tarafından salgılanan sitokinler, hem lökosit migrasyonuna neden olup lokal inflamasyona sebep olarak hem de oligodendrosit öncülleri üzerine doğrudan ve reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin üretilmesini sağlayıp dolaylı olarak ak madde hasarına yol açmaktadır (185-187,190,191,211,212).

Son yıllarda, deneysel olarak birçok antiinflamatuvar ve immün düzenleyici molekülün, inflamasyona bağlı beyin hasarını önlemeye yönelik etkileri araştırılmıştır (290,295-297). Bu çalışmalarda beyindeki patolojik değişikliklerin yanında inflamasyonun şiddetinin bir göstergesi olan proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Biz de çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan intrauterin inflamasyon modelinde insanlarda değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan, antiinflamatuvar ve

immün düzenleyici etkileri olan etanersept ve melatoninin fetüs beynindeki lokal inflamasyona olan etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda intrauterine inflamasyon modelinde melatonin ve etanerseptin proinflamatuvar sitokin düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada melatoninin, TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ düzeylerini pozitif kontrole göre belirgin derecede azalttığı ve etanerseptte göre proinflamatuvar sitokin düzeylerini azaltıcı etkisinin daha iyi olduğu gösterildi.

Bu çalışmada, intrauterin LPS enjeksiyonu için kullanılan işlemler ilk kez 2003 yılında Elovitz ve arkadaşları tarafından farelerde preterm doğum modeli olarak geliştirilmiştir (293). Wang ve arkadaşları 2007 yılında bu modeli LPS dozunu modifiye ederek intrauterin inflamasyon modeli olarak uygulamıştır (292). Bu çalışmada laparotomi sonrası uterus açığa çıkarılmış ve sağ uterin horn 1. ve 2. amniyotik keseler arasından, koryonik ve amniyotik membranlar arasına LPS uygulanmıştır. Sonrasında normal doğuma bırakılmış ve yaşayan yavrular postnatal 14. günde sakrifiye edildiğinde LPS uygulanan fetüslerin toplam beyin ağırlığının azaldığı ve hipomyelinizasyon bulgularının olduğu saptanmıştır. Literatürde sıçanlarda intrauterin inflamasyon oluşturmak için şimdiye kadar 2 model uygulanmıştır: Anneye İP LPS enjekte edilerek ve anneye intraservikal olarak LPS enjekte edilerek (28,295). Ancak her iki modelde de fetüs üzerine olan etki anne aracılıklı ve kısa süreli olmaktadır. Bell ve arkadaşlarının intraservikal LPS uygulaması ile yaptıkları çalışmada, LPS sonrası sitokinlerin (TNF- α , IFN- γ ve IL-6) 2. saatten sonra artmaya başladıkları, 6-8 saatte zirve düzeylere eriştiği ve 24. saatten sonra ise neredeyse normal düzeylere döndüğu saptanmıştır (28). Bizim çalışmamızda Wang ve arkadaşlarının uyguladığı model seçilmiştir. Bu sayede koryoamniyotik zarlarda doğrudan inflamasyon oluşturarak fetüse olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızdaki en önemli problem, modeli oluştururken uygulanan cerrahi prosedür ve fetüs kayıplarıydı. Uygulanan cerrahi işlemde otürü annede de belli oranda inflamasyon oldu. Bu sebepten dolayı kontrol grubunda bazı sitokinlerde yüksek değerler ile karşılaştık. Ayrıca hem cerrahi işlem hem de LPS'nin fetüsü doğrudan etkilemesi anne ve fetüs kayıplarının daha fazla

olmasına neden olmaktadır (293). Bizim çalışmamızda da LPS uygulanan gruplarda anne kaybı %50, yaşayan annelerde ise fetüs kaybı %30'du. Kontrol grubunda sadece bir anne kaybettik. Fetüs kaybı %10'nun altındaydı. İntrauterin uygulamalarda LPS'nin etki süresi ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Newnham ve arkadaşlarının koyunlarda yaptığı bir çalışmada, intraamniyotik olarak uygulanan LPS nin yarılanma süresinin 1.7 gün olduğu ve amniyotik sıvınının 15. günden sonra LPS'den temizlendiği saptanmıştır (298). Bizim modelimizde LPS'nin sistemik dolaşımdan izole bir bölgeye yapılması ve koryoamniyotik zarların LPS'ye karşı geçirgen olmaması, LPS'nin koryon ve amniyon zarlarının arasında daha uzun süreli bulunmasına yol açarak, fetüs üzerine olan etkisinin maternal uygulamalara göre daha uzun süreli olmasına yol açmaktadır (292). Çalışmamızdaki gibi uzun süreli LPS ile temas, klinikte daha çok karşılaşılan kronik inflamasyona daha fazla benzeyen bir model oluşturmaktadır. Literatürde intrauterin inflamasyon ve serebral inflamasyon ile ilgili çalışmaların çoğu beyin dokusundaki akut inflamatuvar cevabı araştıran ve genellikle ilk 24 saat içindeki sitokin değişikliklerini gözlemleyen çalışmalardır (28-30). Benzer bir modelde 3. günden sonra sitokin düzeylerindeki değişikliklerle ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın bu konudaki eksikliği doldurmada katkısının olacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, melatoninin grubundaki proinflamatuvar sitokin düzeylerinin diğer gruplara göre daha düşük olduğunu tespit ettik. İstatistiksel analizlerde de IL-6 dışındaki sitokinlerde pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptandı. Melatoninin etkili bir immün düzenleyici molekül olduğu ve hipoksi-iskemi modellerinde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (280). Ancak literatürde intrauterin inflamasyonda melatoninin etkilerini araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Mohan ve arkadaşlarının melatoninin antiinflamatuvar etkilerini araştırdığı bir çalışmada, melatoninin NF- κ B sistemini inhibe ederek sitokin salınımını azalttığı (286) ve doğrudan COX-2 enzimini inhibe ederek, prostaglandin E2 üretimini azaltıp inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir (287). Melatoninin bu etkileri çalışmamızda saptanan melatonin grubundaki düşük sitokin düzeylerini açıklamaktadır.

Ancak melatoninin sitokinler üzerine olan bu olumlu etkisinin yüksek dozlarda ortaya çıktığını gösteren bulgular vardır. Xu ve arkadaşlarının farelerde yaptığı ve melatoninin maternal ve fetal sitokin salınımı üzerine olan etkisini araştırdığı bir çalışmada, LPS öncesi anneye 5mg/kg dozundan uygulanan melatoninin, melatonin uygulanmayanlara göre beyindeki TNF- α ve IL-6'yı azaltmasına rağmen, IL-1 β düzeylerini etkilemediği saptanmıştır (296). Tyagi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, LPS öncesi 5mg/kg melatonin uygulananlarda IL-1 β ve TNF- α düzeyleri beyinde inceledikleri dört bölgenin birinde azalırken, 10 mg/kg uygulananlarda 4 bölgenin tamamında azaldığı saptanmıştır (300). Wu ve arkadaşları ise akut bakteriyel menenjit modelinde melatoninin mikrogial aktivasyonu ve sitokin düzeylerini ancak melatonin 25 mg/kg'ın üzerinde verilirse azalttığını tespit etmiştir (301). Bizim çalışmamızda melatonin 20 mg/kg dozunda uygulandı ve tüm sitokin düzeylerinde azalma tespit edildi.

Literatürde etanerseptin beyin dokusundaki inflamasyona ve sitokin düzeylerine olan etkilerini araştıran çok az çalışma vardır. Campbell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada etanerseptin beyin dokusuna nötrofil göçünü engelleyerek inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (42). Etanerseptin kan beyin bariyerini aşıp aşmadığı yönündeki veriler de yeterli değildir. Aden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, İP IL-1 β uygulaması ile oluşturulan sistemik inflamasyon modelinde etanersept IL-1B öncesi uygulandığında herhangi bir etkisi olmazken, IL-1 β sonrası uygulamada hasarı %50 azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular etanerseptin inflamasyon ile birlikte kan beyin bariyerini geçebildiğini göstermektedir (290). Chio ve arkadaşlarının travmatik beyin hasarı oluşturulan sıçanlarda yaptıkları başka bir çalışmada ise etanerseptin travmaya bağlı beyin hasarını azalttığı ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerini düşürdüğü saptanmıştır (291). Bizim çalışmamızda ise etanerseptin TNF- α dışındaki sitokinlerin seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşürdüğünü tespit ettik.

Etanersept ve melatoninin birlikte uygulandığında ortaya çıkacak antiinflamatuvar etkinliğe dair herhangi bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda her iki ilacı birlikte uyguladığımızda TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ

düzeylerinde her iki ilacın tek uygulamasına göre artış tespit ettik. IL-1 β düzeyleri etanersept+melatonin grubunda kontrol grubunun da üzerindeydi ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu sonuçlar iki ilacın birlikte kullanımında potansiyel antagonistik etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir etki daha önce bildirilmediğinden bu etkinin daha ileri çalışmalar ile araştırılması ve benzer bulgular saptanırsa patofizyolojik mekanizmaların incelenmesi uygun olacaktır.

Kontrol grubunda, TNF- α dışındaki sitokinler pozitif kontrole göre daha düşük seviyede saptandı. Kontrol grubundaki TNF- α düzeyinin pozitif kontrole göre yüksek olması, beklenenin aksine bir durum gibi görünebilir. Ancak Sheng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, invitro olarak TNF- α ve IL-6 ile karşılaşan mikroglialın doz ile orantılı bir şekilde IL-10 salgıladığı ve IL-10 ile karşılaşan mikroglialın TNF- α ve IL-6 salınımını kısıtladığı saptanmıştır (228). Hücre kültürlerinde LPS ile karşılaşan mikroglialın yüksek miktarlarda TNF- α ürettiği ve TNF- α düzeylerinin 12. saatte zirve yaptığı ancak sonrasında artan IL-10 düzeyi ile birlikte TNF- α salınımının giderek azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda akut inflamasyonda TNF- α ve IL-6 uyarısı ile IL-10 salgılanmasının inflamasyonun potansiyel nörotoksik etkilerini azaltmak için koruyucu bir mekanizma olduğu ileri sürülmüştür (228). Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anneye İP olarak uygulanan LPS'den 90 dk sonra fetal beyin dokusunda bakılan TNF- α ve IL-10 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (296). Park ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise intraserebral LPS enjeksiyonu ile inflamasyon oluşturulan sıçanlarda TNF- α düzeylerinin 12-24. saatte en yüksek düzeylerine ulaştıktan sonra 3. günden itibaren belirgin şekilde azaldığı 7. günde ise kontrol grubunun altına indiği gösterilmiştir. Ancak bu sıçanlara LPS ile birlikte anti-IL-10 uygulandığında, 3. günden sonra bile TNF- α düzeylerinin yükselmeye devam ettiği saptanmıştır (299). Bu çalışmada anneye LPS uygulandıktan 5 gün sonra fetüs beyin dokuları alınmıştır. Literatürdeki bu bilgiler, pozitif kontrol grubunda saptadığımız daha düşük TNF- α düzeyinin, LPS uyarısı ile erken

dönemde hızlı bir şekilde yükselen TNF- α seviyelerinin, antiinflamatuvar sistemi aktive etmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

IL-1 β , birçok çalışmada inflamasyona bağlı ak madde hasarı oluşumundaki en önemli faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (165,297). Cai ve arkadaşlarının intraserebral olarak enjekte ettikleri IL-1 β ve TNF- α ile sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada IL-1 β 'nin, TNF- α 'ya göre daha fazla apoptoza yol açtığı ve oligodendrosit gelişimini baskıladığı tespit edilmiştir (121). Ayrıca IL-1 β 'nin TNF- α 'dan farklı olarak eksitotoksik hasara yol açtığı gösterilmiştir. Pang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise intraserebral olarak uygulanan LPS sonrası yükselen TNF- α ve IL-6 düzeyleri 24 saatte normal düzeylere dönerken, IL-1 β seviyelerinin ancak 72 saatte normale döndüğü tespit edilmiştir (207). Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LPS uyarısı ile salgılanan IL-1 β 'nin hem mikroglialdan IL-1 β salınımını hem de astrositlerden IL-6 ve TNF- α salınımını arttırdığı gösterilmiştir (165). Girard ve arkadaşlarının intrauterin inflamasyon modeli oluşturarak sıçanlarda yaptıkları çalışmada, LPS uygulaması sonrası IL-1 β 'nin diğer sitokinlere göre hem plasenta hem de beyin dokusunda çok daha yüksek oranda arttığı saptanmış ve sitokin seviyelerindeki bu yükselmenin ciddi plasenta hasarı ve beyinde ak madde hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (297). Bu sıçanlara LPS ile birlikte IL-1 reseptör antagonisti uygulandığında ise plasental hasarın, ölen fetüs sayısının ve beyin hasarının belirgin derecede azaldığı saptanmıştır. Çalışmamızda IL-1 β düzeyleri melatonin grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede düşüktü. Etanersept grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da pozitif kontrole göre belirgin düzeyde düşüktü. Bu sonuçlar melatonin ve etanerseptin, IL-1 sistemi üzerinden oluşan nörolojik hasar gelişiminin engellenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

IL-6, diğerlerinden farklı olarak anneden plasenta aracılığı ile fetüse iletilebilen bir sitokindir. Zaretsky ve arkadaşlarının insan plasentasını kullanarak yaptığı çalışmada IL-1 ve TNF- α 'nın anneden fetüse iletimi saptanmamışken, IL-6'nın kolayca geçebildiği gözlenmiştir (160). Ayrıca sıçanlarda anneye uygulanan IL-6'nın fetüslere geçtiği saptanmıştır (302). Bundan dolayı annedeki inflamasyonun fetüse iletilmesinde önemli bir aracı

olduğu düşünölmektedir (303). Çalışmamızda melatonin uygulanan gruplarda IL-6 düzeyi diğer gruplara göre daha düşük tespit edildi. Etanersept grubunda ise kontrol grubu ile aynı düzeydeydi. Melatoninin, IL-6 üzerine olan bu etkisinin annede IL-6 salınımını azaltarak oluşturduğu düşünölebilir. Ancak Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melatoninin LPS uygulaması sonrası anne serumu ve amniyotik sıvıda TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürmediği fakat fetüs beyinde TNF- α ve IL-6 düzeylerini düşürdüğu gösterilmiştir (296). Bu sonuç melatoninin doğrudan beyin dokusuna etki ederek inflamasyonu azalttığını düşündörmektedir. Bu sonuca benzer şekilde akut menenjit modeli uygulanan başka bir çalışmada melatoninin uygulanan dozla orantılı bir şekilde IL-6 düzeylerini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (301). Benzer modellerde etanerseptin IL-6 üzerine etkisini inceleyen bir çalışma yoktur. Bu çalışmada pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da IL-6 seviyelerini düşürdüğu görölmüştür. Ancak IL-6'nın beyin hasarı oluşturmada ve diğer proinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine tek başına etkili olmadığı gösterilmiştir. Pang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intraserebral LPS sonrası uygulanan IL-6 antagonistinin, TNF- α ve IL-1 β düzeylerini değiştirmese de nöronal morfolojiyi ve inflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir (304). İntraserebral olarak sadece IL-6 uygulandığında ise herhangi bir inflamasyona veya nöronal hasara yol açmadığı gözlenmiştir. Bu bulgular IL-6'nın doğrudan bir etki yapmadığını, inflamasyona ve hasara yol açan diğer sitokinlerin etkisini arttırdığını göstermektedir. Çalışmamızda tespit edilen melatonin ve etanersept grubundaki daha düşük IL-6 düzeyleri her iki molekülün de inflamasyonun artışını ve hasar oluşumunu azaltabileceğini düşündörmektedir.

Çalışmamızda IFN- γ düzeyinin melatonin ve etanersept grubunda pozitif kontrole göre daha düşük olduğunu saptadık. İstatistiksel olarak ise melatonin grubundaki düşöklük anlamlıydı. İntrauterin inflamasyonlarda beyin dokusunda IFN- γ 'nın yükseldiğini ve beyin hasarı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (212). Bell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anneye uygulanan LPS sonrası 6. saatte IFN- γ 'nın yükseldiği saptanmıştır (28). Ayrıca bu çalışmada diğer sitokinlerin aksine IFN- γ 'nın plasental dokuda

üretimini olmadığı gösterilmiş ve IFN- γ artışının fetal inflamasyonun spesifik bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür. Briscoe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise intravenöz olarak LPS enjekte edilen koyun fetüslerinde, beyin dokusunda IFN- γ artışı gösterilmiştir (212). IFN- γ makrofaj aktivasyonunu sağlayan en önemli sitokindir. Ayrıca beyinde astrositlerin ve mikroglialının MHC II molekülleri oluşturmasını ve glial hücrelerde adhezyon molekülleri sentezlenmesini artırır (305,306). Böylece lökosit göçünü artırır ve nöroinflamasyonu şiddetlendirir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz sonuçlar hem melatonin hem de etanerseptin IFN- γ üzerinden inflamasyonun şiddetlenmesini önleyebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Melatonin ve etanerseptin, intrauterin inflamasyon modelinde beyin dokusundaki proinflamatuvar sitokin düzeylerine etkisi araştırıldı. Melatoninin etkili bir antiinflamatuvar ajan olduğu ve sitokin düzeylerini pozitif kontrole göre anlamlı derecede azalttığı gösterildi. Etanerseptin ise melatonin kadar olmasa da TNF- α dışındaki sitokin düzeylerinde pozitif kontrole göre azalmaya yol açtığı saptandı. Etanersept ve melatoninin birlikte kullanıldığında ise antagonistik etki ile açıklanabilecek sitokin değişikliklerine neden olduğu görüldü. Bu sonuçlar ışığında, melatoninin intrauterin inflamasyon modelinde etanerseptte göre proinflamatuvar sitokin düzeylerini azaltmada daha iyi bir etki gösterdiği ve beyin hasarını azaltmada daha etkili olabileceği saptandı. Hem melatonin hem de etanersept insanlarda değişik tedavilerde kullanılmaktadır. Her iki ilaçla ilgili sonraki yıllarda yapılacak etki ve güvenilirlik çalışmaları belki de perinatal beyin hasarını azaltmaya yönelik yardımcı bir tedavinin bulunmasına kapı açabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Polin RA, Parravicini E, Regan JA, Taeusch HW. Bacterial Sepsis and Meningitis. Ed: Taeusch HW. 8th Edition pp. 551-577. Elsevier Publishing. Philadelphia,USA, 2004.
- 2.Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. Clin Perinatol 2010;37:339-54.
- 3.Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intra-amniotic infection. Am J Obstet Gynecol 1991;164:1317.
- 4.Gantert M, Been JV, Gavilanes AW, Garnier Y, Zimmermann LJ, Kramer BW. Chorioamnionitis: A multiorgan disease of the fetus? J Perinatol 2010;30:Suppl:S21-30.
- 5.Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med 2000;342:1500-1507.
- 6 Eschenbach DA. Ureaplasma urealyticum and premature birth. Clin Infect Dis 1993;17:S100-6.
- 7.Faye-Petersen OM. The placenta in preterm birth. J Clin Pathol 2008;61:1261-1275.
- 8.Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. Intraamniotic infection in low-birth-weight infants. J Infect Dis 1988;157:113-7.
- 9.Redline RW. Placental inflammation. Semin Neonatol 2004;9:265-74.
- 10.Abbas KA, Lichtman AH, Pillai. Cytokins S. Ed: Abbas KA, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 6th Edition pp. 267-302. Saunders Elsevier Philadelphia,USA, 2007.
- 11.Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O et al. The fetal inflammatory response syndrome. Clin Obstet Gynecol 2007;50:652-683.
- 12.El-Haieg DO, Zidan AA, El-Nemr MM. The relationship between sonographic fetal thymus size and the components of the systemic fetal inflammatory response syndrome in women with preterm prelabour rupture of membranes.BJOG 2008;115:836–41.
- 13.Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 2008;371:75-84.

- 14.ACOG Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. ACOG practice bulletin.Management of preterm labor.Int JGynaecol Obstet 2003;82:127–35.
- 15.Andrews WW, Goldenberg RL, Mercer B et al. The Preterm Prediction Study: association of second-trimester genitourinary chlamydia infection with subsequent spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2000;183:662-668.
- 16.Berry SM, Romero R, Gomez R et al. Premature parturition is characterized by in utero activation of the fetal immune system. Am J Obstet Gynecol 1995;173:1315-1320.
- 17.Cornette L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. Semin Fetal Neonatal Med. 2004;9:459-70.
- 18.Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL. Chorioamnionitis and cerebral palsy: a meta-analysis. Obstet Gynecol. 2010;116:387-92.
- 19.Jonakait GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. Int J Dev Neurosci. 2007;25:415-25.
- 20.Dammann O, Leviton A. Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. Semin Fetal Neonatal Med. 2006;11:363-8.
- 21.Bale JF Jr. Fetal infections and brain development. Clin Perinatol. 2009;36:639-53.
- 22.Yoon BH, Romero R, ParkJS et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. Am J Obstet Gynecol 2000;182:675-681.
- 23.Fung G, Bawden K, Chow P et al. Chorioamnionitis and outcome in extremely preterm infants. Ann Acad Med Singap 2003;32:305-310.
- 24.Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. Brain Res Rev 1999;30:107-134.
- 25.Wu YW, Colford Jr JM. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: a meta-analysis. JAMA 2000;284:1417-1424.
- 26.Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O et al. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very

- low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators. *Pediatr Res* 1999;46:566-575.
- 27.Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *JAMA* 2003;290:2677-2684.
- 28.Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatric Res* 2004;56:541–546.
- 29.Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Res* 2000;47:64–72.
- 30.Liverman CS, Kaftan HA, Cui L, Hersperger SG, Taboada E, Klein RM, Berman NE. Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection. *Neurosci Lett* 2006;399:220–225.
- 31.Feldhaus B, Dietzel ID, Berger R. TNF- α induces cell death in primary cultures of oligodendrocyte progenitors. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:248.
- 32.Yu HM, Yuan TM, Gu WZ, Li JP. Expression of glial fibrillary acidic protein in developing rat brain after intrauterine infection. *Neuropathology* 2004;24:136–143.
- 33.Elovitz MA, Mrinalini C, Sammel MD. Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth. *Pediatr Res* 2006;59:50–55.
- 34.Mallard C, Welin AK, Peebles D, Hagberg H, Kjellmer I. White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep. *Neurochem Res* 2003;28:215–223.
- 35.Olivier P, Fontaine RH, Loron G, Van Steenwinckel J, Biran V, Massonneau V, Kaindl A, Dalous J, Charriaut-Marlangue C, Aigrot MS, Pansiot J, Verney C, Gressens P, Baud O. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One* 2009;4:e7128.

- 36.Sun FY, Lin X, Mao LZ, Ge WH, Zhang LM, et al. Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. *J Pineal Res* 2002;33: 48–56.
- 37.Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *Faseb J* 2004;18:149–151.
- 38.Kilic U, Kilic E, Reiter RJ. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 2005;38:67–71.
- 39.Floreani M, Skaper SD, Facci L, Lipartiti M, Giusti P. Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *Faseb J* 1997;11:1309–1315.
- 40.Pei Z, Cheung RT. Melatonin protects SHSY5Y neuronal cells but not cultured astrocytes from ischemia due to oxygen and glucose deprivation. *J Pineal Res* 2003;34:194–201.
- 41.Guthmann F, Wissel H, Rüstow B. Early subcutaneous administration of etanercept (Enbrel) prevents from hyperoxia-induced lung injury. *Exp Lung Res* 2009;35:770-80.
- 42.Campbell SJ, Jiang Y, Davis AE, Farrands R, Holbrook J, Leppert D, Anthony DC. Immunomodulatory effects of etanercept in a model of brain injury act through attenuation of the acute-phase response. *J Neurochem* 2007;103:2245-55.
- 43.Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Baltaci AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R. Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res* 2004;79:357-65.
- 44.Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome. *Placenta* 2010;31:113-20.
- 45.Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 2005;32:571–600.

46. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287–96.
47. Park CW, Moon KC, Park JS, Jun JK, Romero R, Yoon BH. The involvement of human amnion in histologic chorioamnionitis is an indicator that a fetal and an intra-amniotic inflammatory response is more likely and severe: clinical implications. *Placenta* 2009;30:56–61.
48. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988;319:972–80.
49. Pankuch GA, Appelbaum PC, Lorenz RP, Botti JJ, Schachter J, Naeye RL. Placental microbiology and histology and the pathogenesis of chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 1984;64:802–806.
50. Duff P, Sanders R, Gibbs RS. The course of labor in term patients with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:391–395.
51. Redline R, Heller D, Keating S, Kingdom J. Placental diagnostic criteria and clinical correlation— a workshop report. Issue null. *Placenta* 2005;26:S114–7.
52. Zhang JM, Kraus FT, Aquino TI. Chorioamnionitis: a comparative histologic, bacteriologic, and clinical study. *Int J Gynecol Pathol* 1985;4:1-10.
53. Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982;145:1–8.
54. Alexander JM, Gilstrap LC, Cox SM, McIntire DM, Leveno KJ. Clinical chorioamnionitis and the prognosis for very low birth weight infants. *Obstet Gynecol* 1998;91:725–9.
55. Smulian JC, Shen-Schwarz S, Vintzileos AM, Lake MF, Ananth CV. Clinical chorioamnionitis and histologic placental inflammation. *Obstet Gynecol* 1999;94:1000–1005.
56. Heller DS, Rimpel LH, Skurnick JH. Does histologic chorioamnionitis correspond to clinical chorioamnionitis? *J Reprod Med* 2008;53:25–28.

57. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipour S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:534–539.
58. Tasci Y, Dilbaz B, Onal BU, Caliskan E, Dilbaz S, Doganci L, et al. The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;128:34–39.
59. Tsuda A, Ikegami T, Hirano H, Sanada H, Ogawa M, Sasaki M, et al. The relationship between amniotic fluid interleukin-6 concentration and histologic evidence of chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:515–520.
60. MacVicar J. Chorioamnionitis. *Clin Obstet Gynecol* 1970;13:272–290.
61. Kobak AJ. Fetal bacteremia: a contribution to the mechanism of intrauterine infection and to the pathogenesis of placentitis. *Am J Obstet Gynecol* 1930;19:299–316.
62. Knox IC, Hoerner JK. Role of infection in premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1950;59:190.
63. Hawkinson JA, Schulman H. Prematurity associated with cervicitis and vaginitis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1966;94:898–902.
64. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, et al. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988;12:262–279.
65. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:817–824.
66. Virchow R. Über interstitielle Encephalitis. *Virchow Arch Pathol Anat* 1868;44:472–476.
67. Little WJ. The influence of abnormal parturition, difficult labours, premature birth and asphyxia neonatorum on the mental and physical condition of the child, especially in relation to deformities. *Trans Obstet Soc London* 1861;3:293–344.

- 68.Parrot J. Etude sur l'encéphalopathie urémique et le tetanus. Arch General Med 1872;19:257–275.
- 69.Parrot J. Etude sur l'encéphalopathie urémique et le tetanus. Arch General Med 1872;20:158–191.
- 70.Parrot J. Etude sur le ramollissement de l'encéphale chez le nouveau-né. Arch Physiol Norm Pat 1873;5:59–73.
- 71.Rydberg E. Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma; with an inquiry into the normal and pathological anatomy of the neuroglia. Acta Pathol Microbiol Scand 1932;S7–10:1–247.
- 72.Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. Arch Neurol 1962;7:386–410.
- 73.Leviton A, Gilles F, Neff R, et al. Multivariate analysis of risk of perinatal telencephalic leukoencephalopathy. Am J Epidemiol 1976;104:621–6.
- 74.Gilles FH, Leviton A, Kerr CS. Endotoxin leukoencephalopathy in the telencephalon of the newborn kitten. J Neurol Sci 1976;27:183–91.
- 75.Gilles FH, Averill DR, Kerr CS. Neonatal endotoxin encephalopathy. Ann Neurol 1977;2(1):49–56.
- 76.Ornoy A, Altshuler G. Maternal endotoxemia, fetal anomalies, and central nervous system damage rat model of a human problem. Am J Obstet Gynecol 1976;124:196–204.
- 77.Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of low and very low birth-weight and the relation of these to cerebral-palsy. JAMA 1985;254:1473–1479.
- 78.Leviton A, Gilles FH. Acquired perinatal leukoencephalopathy. Ann Neurol 1984;16:1–8.
- 79.Wang XY, Rousset CI, Hagberg H, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. Semin Fetal Neonatal Med 2006;11: 343–353.
- 80.Dammann O, Leviton A. Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. Semin Pediatr Neurol 1998;5:190–201.
- 81.Hagberg H, Mallard C. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. Curr Opin Neurol 2005;18:117–23.

82. Dammann O, Leviton A. Inflammatory brain damage in preterm newborns: dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum Dev* 2004;79:1–15.
83. Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, et al. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375–83.
84. Dammann O, Leviton A. Intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res* 1997;42:1–8.
85. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:757–789.
86. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, et al. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:69–87.
87. Yoon BH, Romero R, Park JS, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1254–1260.
88. Witt A, Berger A, Gruber CJ, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of the membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1663–1669.
89. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002;109:34–43.
90. Silver HM. Listeriosis during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1998;53:737–740.
91. Anells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, McDonald HM. Polymorphisms in immunoregulatory genes and the risk of histologic chorioamnionitis in Caucasian women: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2005;5:4.
92. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;141:3-9.
93. Baier RJ. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infant. *Front Biosci* 2006;11:1371–1387.

94. Mcguire W, Hill AV, Allsopp CE, et al. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994;371:508–511.
95. Papile LA, Munsickbruno G, Schaefer A. Relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early-childhood neurologic handicaps. *J Pediatr* 1983;103:273–277.
96. Gibson CS, MacLennan AH, Goldwater PN, et al. The association between inherited cytokine polymorphisms and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:674–80.
97. Harding DR, Dhamrait S, Whitelaw A, et al. Does interleukin-6 genotype influence cerebral injury or developmental progress after preterm birth? *Pediatrics* 2004;114:941–7.
98. Harding D, Brull D, Humphries SE, et al. Variation in the interleukin-6 gene is associated with impaired cognitive development in children born prematurely: a preliminary study. *Pediatr Res* 2005;58:117–20.
99. Dordelmann M, Kerk J, Dressler F, et al. Interleukin-10 high producer allele and ultrasound-defined periventricular white matter abnormalities in preterm infants: a preliminary study. *Neuropediatrics* 2006;37:130–6.
100. Hunt JS, Fishback JL. Amniochorion: immunologic aspects – a review. *Am J Reprod Immunol* 1989;21:114–118.
101. Offenbacher S. Maternal periodontal infections, prematurity, and growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*. 2004 Dec;47:808–21.
102. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: a prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:562.
103. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:795.
104. Newton ER, Prihoda TJ, Gibbs RS. Logistic regression analysis of risk factors for intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1989;73:571.
105. Tran SH, Caughey AB, Musci TJ. Meconium-stained amniotic fluid is associated with puerperal infections. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:746.

106. Yoon BH, Romero R, Moon JB, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1130–1136.
107. Alexander JM, McIntire DM, Leveno KJ. Chorioamnionitis and the prognosis for term infants. *Obstet Gynecol* 1999;94:274–278.
108. Seong HS, Lee SE, Kang JH, et al. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:375.e1–5.
109. Blume HK, Li CI, Loch CM, et al. Intrapartum fever and chorioamnionitis as risks for encephalopathy in term newborns: a case-control study. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:19–24.
110. Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, et al. The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:211.
111. Soper DE, Mayhall CG, Froggatt JW. Characterization and control of intraamniotic infection in an urban teaching hospital. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175: 304–9.
112. Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL, et al. International Multicentre Term Prelabor Rupture of Membranes Study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1024–1029.
113. Yancey MK, Duff P, Clark P, et al. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol* 1994;84:816–819.
114. Abele-Horn M, Peters J, Genzel-Boroviczeny O, et al. Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection* 1997;25:286–91.
115. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 1997;278:207-211.
116. Rickert VI, Wiemann CM, Hankins GD, et al. Prevalence and risk factors of chorioamnionitis among adolescents. *Obstet Gynecol* 1998;92:254–257.

117. Anderson BL, Simhan HN, Simons KM, et al. Untreated asymptomatic group B streptococcal bacteriuria early in pregnancy and chorioamnionitis at delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:524.e1–5
118. Newton ER, Piper J, Peairs W. Bacterial vaginosis and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:672–677.
119. Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol*. 2008;35:643-663.
120. Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate* 2001;79: 224–227.
121. Cai ZW, Lin SY, Pang Y, et al. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2004;56:377–84.
122. Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, et al. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* 2005;128:2675–2688.
123. Pang Y, Cai ZW, Rhodes PG. Effect of tumor necrosis factor-alpha on developing optic nerve oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res* 2005;80:226–234.
124. Cammer W, Zhang H. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF-alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 1999;97:37–42.
- 125. Middleton allergy sitokinler**
126. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 1989;491:394–397.
127. Lee SC, Liu, W Dickson, DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 1993;150:2659–2667.
128. Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 1994;16:212–221.

129. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:194–202.
130. Pacora P, Chaiworapongsa T, Maymon E, Kim YM, Gomez R, Yoon BH, Ghezzi F, Berry SM, Qureshi F, Jacques SM, Kim JC, Kadar N, Romero R. Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11:18–25.
131. Hollier LM. Preventing preterm birth: what works, what doesn't. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:124–131.
132. Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988;31:553–584.
133. Cox SM, Casey ML, MacDonald PC. Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Hum Reprod Update* 1997;3:517–527.
134. Casey ML, MacDonald PC. The endocrinology of human parturition. *Ann N Y Acad Sci* 1997;828:273–284.
135. Romero R, Nores J, Mazor M, Sepulveda W, Oyarzun E, Parra M, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity during term labor. Prevalence and clinical significance. *J Reprod Med* 1993;38:543–548.
136. Romero R, Mazor M, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer DM. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:414–429.
137. Romero R, Salafia CM, Athanassiadis AP, Hanaoka S, Mazor M, Sepulveda W, et al. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1382–1388.
138. Cunningham, MacDonald PC. In: *Williams Obstetrics*. Chapter 12 Parturition: biomolecular and physiologic processes 1994:297–361.
139. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD et al. Births: final data for 2002. National vital statistics reports. National Center for Health, Hyattsville, MD. 2003;52;10.

- 140.Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 2009;123:1314-1319.
- 141.Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Maternal versus fetal inflammation and respiratory distress syndrome: a 10-year hospital cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009;94:F13-F16.
- 142.Wenstrom KD, Andrews WW, Hauth JC et al. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:546–550.
- 143.Jobse AH. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 200;8:9-17.
- 144.Wood NS, Marlow N, Costeloe K et al. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:378–384.
- 145.Wood NS, Costeloe K, Gibson AT et al. The EPICure study: associations and antecedents of neurological and developmental disability at 30 months of age following extremely preterm birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F134–F140.
- 146.Greisen G, Pryds O. Low CBF discontinuous EEG activity and periventricular brain injury in ill, preterm neonates. *Brain Dev* 1989;11:164–168.
- 147.Edwards AD, Wyatt JS, Richardson C et al. Cotside measurement of cerebral blood flow in ill newborn infants by near infrared spectroscopy. *Lancet* 1988;2:770–771.
- 148.Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:425-436.
- 149.Sarkar S, Kaplan C, Wiswell TE, Spitzer AR. Histological chorioamnionitis and the risk of early intraventricular hemorrhage in infants born < or = 28 weeks gestation. *J Perinatol* 2005;25:749-752.
- 150.Nelson KB & Grether JK. Potentially asphyxiating conditions and spastic cerebral palsy in infants of normal birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:507–513.

151. Yoon BH, Romero R, Jun JK et al. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:825–830.
152. Martinez E, Figueroa R, Garry D et al. Elevated amniotic fluid interleukin-6 as a predictor of neonatal periventricular leukomalacia and intraventricular hemorrhage. *J Mat Fetal Invest* 1998;8:101–107.
153. Murthy V, Kennea NL. Antenatal infection/inflammation and fetal tissue injury. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21:479-489.
154. Woodward LJ, Anderson PJ, Austin NC, Howard K, Inder TE. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. *N Engl J Med* 2006;355:685-694.
155. Duggan PJ, Maalouf EF, Watts TL et al. Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet* 2001;358:1699–1700.
156. Hood IC, Browning D, de Sa DJ, Whyte RK. Fetal inflammatory response in second trimester candidal chorioamnionitis. *Early Hum Dev* 1985;11:1–10.
157. Beloosesky R, Gayle DA, Amidi F, Nunez SE, Babu J, Desai M, Ross MG. N-Acetyl-cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:268–273.
158. Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R1024–R1029.
159. Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol* 2005;106:802–807.
160. Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstetrics Gynecol* 2004;103:546–550.

161. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 1996;19:331–338.
162. Barna BP, Estes ML, Jacobs BS, Hudson S, Ransohoff RM. Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *J Neuroimmunol* 1990;30:239–243.
163. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;56:307–340.
164. Dziegielewska KM, Moller JE, Potter AM, Ek J, Lane MA, Saunders NR. Acute-phase cytokines IL-1beta and TNF-alpha in brain development. *Cell Tissue Res* 2000;299:335–345.
165. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1beta. *J Immunol* 1993;150:2659–2667.
166. Dammann O, Bueter W, Leviton A, et al. Neuregulin-1: a potential endogenous protector in perinatal brain white matter damage. *Neonatology* 2008;93:182–187.
167. Vartanian T, Fischbach G, Miller R. Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:731–735.
168. Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P, Saliba E. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;59:428–433.
169. Okoshi Y, Itoh M, Takashima S. Characteristic neuropathology and plasticity in periventricular leukomalacia. *Pediatr Neurol* 2001;25:221–226.
170. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001;56:1278–1284.

171. Deguchi K, Mizuguchi M, Takashima S. Immunohistochemical expression of tumor necrosis factor alpha in neonatal leukomalacia. *Pediatr Neurol* 1996;14:13–16.
172. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res* 1997;42:1–8.
173. Gilmore JH, Fredrik JL, Vadlamudi S, Lauder JM. Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1221–1229.
174. Rezaie P, Dean A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology* 2002;22:106-132.
175. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;117:145–152.
176. Navascues J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 2000;72:91–102.
177. Kitamura Y, Nomura Y. Stress proteins and glial functions: possible therapeutic targets for neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther* 2003;97:35–53.
178. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihar T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 2001;65:322–331.
179. Heese K, Hock C, Otten U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* 1998;70:699–707.
180. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JYF, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999;19:1708–1716.

181. Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2000;7:574–585.
182. Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2005;37:1145–1150.
183. Weiss JM, Berman JW. Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol* 1998;91:190–197.
184. Girvin AM, Gordon KB, Welsh CJ, Clipstone NA, Miller SD,. Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells. *Blood* 2002;99:3692–3701.
185. Aschner M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol Lett* 1998;102–103:283–287.
186. Schmitz T, Chew LJ. Cytokines and myelination in the central nervous system. *Sci World J* 2008;8:1119–1147.
187. Back SA, Rivkees SA. Emerging concepts in periventricular white matter injury. *Semin Perinatol* 2004;28:405-414.
188. Jonakait GM, Luskin MB, Wei R, Tian XF, Ni L. Conditioned medium from activated microglia promotes cholinergic differentiation in the basal forebrain in vitro. *Dev Biol* 1996;177:85–95.
189. Merrill JE, Jonakait GM. Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J* 1995;9:611–618.
190. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F153-F161.
191. Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol* 1998;5:180-189.
192. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:396–401.
193. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are

hypo-responsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749–3752.

194. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.

195. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430:257-263.

196. Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, Yu HM. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling. *J Neuroimmunol*. 2010;229:16-25.

197. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675–680.

198. Abrahams VM, Aldo PB, Murphy SP, Visintin I, Koga K, Wilson G, Romero R, Sharma S, Mor G. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. *J Immunol* 2008;180:6035–6043.

199. Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun* 2008;22:140–147.

200. Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007;2:297–312.

201. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1013–1021.

202. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004;173:3916–3924.

203. Sharangpania A, Takanohashia A, Bell MJ. Caspase activation in fetal rat brain following experimental intrauterine inflammation. *Brain Res* 2008;1200:138–145.

204. Shen Y, Yu HM, Yuan TM, Gu WZ, Wu YD. Intrauterine infection induced oligodendrocyte injury and inducible nitric oxide synthase expression in developing rat brain. *J Perinat Med* 2007;35:203–209.

205. Froen JF, Munkeby BH, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2002;942:87–94.
206. Jensen A, Garnier Y, Middelani J, Berger R. Perinatal brain damage—from pathophysiology to prevention. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:S70–S79.
207. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res* 2003;140:205–214.
208. Paintlia MK, Paintlia AS, Barbosa E, Singh I, Singh AK. N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res* 2004;78:347–361.
209. Chen JC, Ho FM, Pei-Dawn Lee, Chao Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee ST, Wen Tung, W Lin WW. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on hemoxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* 2005;521:9–20.
210. Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9936–9941.
211. Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 2000;32:51–59.
212. Briscoe T, Duncan J, Cock M, Choo J, Rice G, Harding R, Scheerlinck JP, Rees S. Activation of NF-kappaB transcription factor in the preterm ovine brain and placenta after acute LPS exposure. *J Neurosci Res* 2006;83:567–574.
213. Girard S, Kadhim H, Roy M, Lavoie K, Brochu ME, Larouche A, Sébire G. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 2009;40:168-174.

- 214.Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Meinel E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology* 2007;68:S58–63.
- 215.Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. BAFF is produced by astrocytes and upregulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 2005;201:195–200.
- 216.Bruce AJ, Boling W, Kindy MS et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996;2:788–794.
- 217.Hagberg H, Dammann O, Mallard C, Leviton A. Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol* 2004;28:389-395.
- 218.Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H. Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatr Res* 2005;58:112-116.
- 219 Mallard C, Hagberg H. Inflammation-induced preconditioning in the immature brain. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:280-286.
- 220.Furuya K, Zhu L, Kawahara N, Abe O, Kirino T. Differences in infarct evolution between lipopolysaccharide-induced tolerant and nontolerant conditions to focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2005;103:715-723.
- 221.Huang CY, Yang HI, Chen SD, Shaw FZ, Yang DI. Protective effects of lipopolysaccharide preconditioning against nitric oxide neurotoxicity. *J Neurosci Res* 2008;86:1277-1289.
- 222.Orio M, Kunz A, Kawano T, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Lipopolysaccharide induces early tolerance to excitotoxicity via nitric oxide and cGMP. *Stroke* 2007;38:2812-2817.
- 223.Rosenzweig HL, Lessov NS, Henshall DC, Minami M, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. *Stroke* 2004;35:2576-2581.
- 224.Saha RN, Liu A, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:212–222.

- 225.Chikanza IC, Grossman AB. Neuroendocrine immune responses to inflammation: the concept of the neuroendocrine immune loop. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10:199-225.
- 226.Lodge PA, Sriram S. Regulation of microglial activation by TGF- α , IL-10, and CSF-1. *J Leukoc Biol* 1996;60:502–508.
- 227 Heyen JR, Ye S, Finck BN, Johnson RW. Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF- κ B. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;77:138–147.
- 228.Sheng WS, Hu S, Kravitz FH, Peterson PK, Chao CC. Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:604–608.
- 229.Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, et al. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 1999;5:49–55.
- 230.Otten U, Marz P, Heese K, Hock C, Kunz D, Rose-John S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:322-330.
- 231.Groneck P, Goetze-Speer B, Speer CP. Inflammatory bronchopulmonary response of preterm infants with microbial colonisation of the airways at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;74:F51–F55.
- 232.Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1995;19:371–378.
- 233.Watterberg KL, Demers LM, Scott SM et al. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996;97:210–215.
- 234.Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M et al. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994;93:712–718.
- 235.Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003;8:29-38.

236. Bry K, Lappalainen U & Hallman M. Intraamniotic interleukin-1 accelerates surfactant protein synthesis in fetal rabbits and improves lung stability after premature birth. *J Clin Invest* 1997;99:2992–2999.
237. Jobe AH, Newnham JP, Willet KE et al. Endotoxin-induced lung maturation in preterm lambs is not mediated by cortisol. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1656–1661.
238. Ikegami M, Moss TJ, Kallapur SG et al. Minimal lung and systemic responses to TNF-alpha in preterm sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L121–L129.
239. Shimoya K, Taniguchi T, Matsuzaki N, et al. Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration. *Hum Reprod* 2000;15:2234–2240.
240. Elimian A, Verma U, Beneck D, Cipriano R, Visintainer P, Tejani N. Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes. *Obstet Gynecol* 2000;96:333–336.
241. Hannaford K, Todd DA, Jeffery H, John E, Blyth K, Gilbert GL. Role of ureaplasma urealyticum in lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F162–167.
242. Been JV, Zimmermann LJ. Histological chorioamnionitis and respiratory outcome in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009;94:F218–F225.
243. Kumar R, Yu Y, Story RE, Pongracic JA, Gupta R, Pearson C et al. Prematurity, chorioamnionitis, and the development of recurrent wheezing: a prospective birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:878–884.
244. Dammann O, Brinkhaus MJ, Bartels DB, Dordelmann M, Dressler F, Kerk J et al. Immaturity, perinatal inflammation, and retinopathy of prematurity: a multi-hit hypothesis. *Early Hum Dev* 2009;85:325–329.
245. De Felice C, Bagnoli F, Toti P, Musaro MA, Peruzzi L, Paffetti P et al. Transient hypothyroxinemia of prematurity and histological chorioamnionitis. *J Perinat Med* 2005;33:514–518.

- 246.Back SA, Luo NL, Borenstein NS et al. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001;21:1302–1312.
- 247.Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6:99–108.
- 248.Haynes RL, Folkerth RD, Keefe RJ et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:441–450.
- 249.Back SA, Han BH, Luo NL et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxiaischemia. *J Neurosci* 2002;22:455–463.
- 250.Back SA, Volpe JJ. Cellular and molecular pathogenesis of periventricular white matter damage. *Ment Retard Dev* 1997;3:96-107.
- 251.Gavilanes AW, Strackx E, Kramer BW, Gantert M, Van den Hove D, Steinbusch H et al. Chorioamnionitis induced by intraamniotic lipopolysaccharide resulted in an interval-dependent increase in central nervous system injury in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:e431-e438.
- 252.Young RS, Hernandez MJ, Yagel SK. Selective reduction of blood flow to white matter during hypotension in newborn dogs: a possible mechanism of periventricular leukomalacia. *Ann Neurol* 1982;12:445–448.
- 253.Young RS, Yagel SK, Towfighi J. Systemic and neuropathologic effects of *E. coli* endotoxin in neonatal dogs. *Pediatr Res* 1983;17:349–353.
- 254.Yoon BH, Kim CJ, Romero R et al. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:797–802.
- 255.Haesaert B, Ornoy A. Transplacental effects of endotoxemia on fetal mouse brain, bone, and placental tissue. *Pediatr Pathol* 1986;5:167–181.
- 256.Peebles DM, Miller S, Newman JP et al. The effect of systemic administration of lipopolysaccharide on cerebral haemodynamics and oxygenation in the 0.65 gestation ovine fetus in utero. *BJOG* 2003;110:735–743.

- 257.Nitsos I, Rees SM, Duncan J et al. Chronic exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide affects the ovine fetal brain. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:239–247.
- 258.Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 2001;15:155–163.
- 259.Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 2002;3:216–227.
- 260.Coumans AB, Middelanis JS, Garnier Y, Vaihinger HM, Leib SL, Von Duering MU et al. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxiceischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res* 2003;53:770-775.
- 261.Lehnhardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002;22:2478-2486.
- 262.Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide- induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res* 2003;975:37-47.
- 263.Duncan JR, Cock ML, Scheerlinck JP, Westcott KT, McLean C, Harding R et al. White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus. *Pediatr Res* 2002;52:941-949.
- 264.Garnier Y, Berger R, Alm S, von Duering MU, Coumans AB, Michetti F et al. Systemic endotoxin administration results in increased S100B protein blood levels and periventricular brain white matter injury in the preterm fetal sheep. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124:15-22.
- 265.Duncan JR, Cock ML, Suzuki K, Scheerlinck JP, Harding R, Rees SM. Chronic endotoxin exposure causes brain injury in the ovine fetus in the absence of hypoxemia. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:87-96.
- 266.Rounioja S, Rasanen J, Glumoff V, Ojaniemi M, Makikallio K, Hallman M. Intra-amniotic lipopolysaccharide leads to fetal cardiac dysfunction. A mouse model for fetal inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2003;60:156-164.

- 267.Kramer BW, Moss TJ, Willet KE, Newnham JP, Sly PD, Kallapur SG et al. Dose and time response after intraamniotic endotoxin in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:982-988.
- 268.Poggi SH, Park J, Toso L, Abebe D, Roberson R, Woodard JE et al. No phenotype associated with established lipopolysaccharide model for cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:727-733.
- 269.Bell MJ, Hallenbeck JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. *J Neurosci Res* 2002;70:570-579.
- 270.Silver RM, Edwin SS, Trautman MS, Simmons DL, Branch DW, Dudley DJ et al. Bacterial lipopolysaccharide-mediated fetal death. Production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995;95:725-731.
- 271.Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. A 'minimum dose' of lipopolysaccharide required for implantation failure: assessment of its effect on the maternal reproductive organs and interleukin-1 alpha expression in the mouse. *Reproduction* 2004;128:87-97.
- 272.Kohmura Y, Kirikae T, Kirikae F, Nakano M, Sato I. Lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS. *Microbiol Immunol* 2000;44:897-904.
- 273.Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatr* 2006;11:47-55.
- 274.Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res* 2001;47:27-36.
- 275.Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. *J Neuroimmunol* 2003;138:49-55.
- 276.Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005;48:903-917.

- 277.Hava G, Vered L, Yael M, et al. Alternations in behaviour in adults offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 2006;48:162–168.
- 278.Fan LW, Pang Y, Lin S, et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 2005;133:159–168.
- 279.Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res* 2003;34:95–102.
- 280.Welin AK, Svedin P, Lapatto R, et al. Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. *Pediatr Res* 2007;61:153–158.
- 281.Manev H, Uz T, Kharlamov A, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *Faseb J* 1996;10:1546–1551.
- 282.Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, et al. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 2005;15:225–233.
- 283.Rosenbluth J. Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol* 1980;194:639–648.
- 284.Matuszak Z, Reszka K, Chignell CF. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic Biol Med* 1997;23:367–372.
- 285.Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007;42:28–42.
- 286.Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37:1063–1070.
- 287.Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, et al. Antiinflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-

- formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005;165:139–149.
- 288.Martin V, Sainz RM, Antolin I, Mayo JC, Herrera F, et al. Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin. *J Pineal Res* 2002;33:204–212.
- 289.Borlongan CV, Su TP, Wang Y. Treatment with delta opioid peptide enhances in vitro and in vivo survival of rat dopaminergic neurons. *Neuroreport* 2000;11:923–926.
- 290.Adén U, Favrais G, Plaisant F, Winerdal M, Felderhoff-Mueser U, Lampa J, Lelièvre V, Gressens P. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNF-alpha pathway and protection by etanercept. *Brain Behav Immun* 2010;24:747-758.
- 291.Chio CC, Lin JW, Chang MW, Wang CC, Kuo JR, Yang CZ, Chang CP. Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury. *J Neurochem* 2010;115:921-929.
- 292.Wang X, Hagberg H, Zhu C, Jacobsson B, Mallard C. Effects of intrauterine inflammation on the developing mouse brain. *Brain Res* 2007;1144:180-185.
- 293.Elovitz MA, Wang Z, Chien EK, Rychlik DF, Phillippe M. A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4. *Am J Pathol* 2003;163:2103-2111.
- 294.Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 2007;92:269-278.
295. Yildirim G, Attar R, Ficicioglu C, Karateke A, Ozkan F, Yesildaglar N. Etanercept causes regression of endometriotic implants in a rat model. *Arch Gynecol Obstet* 2010;10:1543-1549.
- 296.Xu DX, Wang H, Ning H, Zhao L, Chen YH. Maternally administered melatonin differentially regulates lipopolysaccharide-induced proinflammatory

- and anti-inflammatory cytokines in maternal serum, amniotic fluid, fetal liver, and fetal brain. *J Pineal Res* 2007;43:74-79.
297. Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sébire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol* 2010;184:3997-4005.
298. Newnham JP, Kallapur SG, Kramer BW, Moss TJ, Nitsos I, Ikegami M, Jobe AH. Betamethasone effects on chorioamnionitis induced by intra-amniotic endotoxin in sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:1458-1466.
299. Park KW, Lee HG, Jin BK, Lee YB. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Exp Mol Med* 2007;39:812-819.
300. Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *Eur J Pharmacol* 2010;640:206-210.
301. Wu UI, Mai FD, Sheu JN, Chen LY, Liu YT, Huang HC, Chang HM. Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *J Pineal Res* 2011;50:159-170.
302. Dahlgren J, Samuelsson AM, Jansson T, Holmäng A. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res* 2006;60:147-151.
303. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci.* 2007;27:695-702.
304. Pang Y, Fan LW, Zheng B, Cai Z, Rhodes PG. Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats. *Neuroscience* 2006;141:745-755.
305. Panek RB, Benveniste EN. Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. *J Immunol* 1995;154:2846-2854.

306. Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol* 1994;51:209–220.