

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**MATERNAL VE FETAL SİTOKİN GENOTİPLERİNİN TERM VE
PRETERM DOĞUMLARLA İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyolog Yaprak Yılmaz

ANKARA, 2010

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**MATERNAL VE FETAL SİTOKİN GENOTİPLERİNİN TERM VE
PRETERM DOĞUMLARLA İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu KA09/191
numaralı projesi olarak desteklenmiştir.

Biyolog Yaprak Yılmaz

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

ANKARA, 2010

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Dalında Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:24/08/2010

“Maternal ve Fetal İnflamatuar Sitokin Genotiplerinin Preterm Doğumlarla İlişkisinin Araştırılması”

TEZ DANIŞMANI: Prof.Dr.Fatma Belgin ATAÇ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof.Dr.Fatma Belgin ATAÇ

Prof.Dr.Feride İffet ŞAHİN

Prof.Dr.Namık ÖZBEK

ONAY:Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun 31.08. 2010 tarih, 103 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof.Dr.Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren bana güvenen ve her konuda desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç'a;

Eğitimimdeki katkılarından dolayı aynı zamanda bölüm bölüm başkanımız da olan Prof. Dr. Feride İffet Şahin'e ve Yrd. Doç. Dr. Erkan Yurtcu'ya;

Eğitimimin her aşamasında desteğini esirgemeyip, bilgi ve katkılarından dolayı Uzm. Bio. Hasibe Verdi'ye, laboratuvar arkadaşım Yüksel Süer'e ve Maltepe Tıbbi Genetik ekibine;

Akademik hayata başlamamda destek olup her zaman yanımda olan Alper Yalçın'a, tez çalışmam boyunca gösterdikleri yardımseverlik için canım arkadaşlarım Uzm. Bio. Ezgi Sezgin'e ve Uzm. Bio. Ayşe Taneri'ye;

Ve son olarak hayatımın her döneminde yanımda olup, her sıkıntıda yardımına koşan ve beni hayata hazırlayan çok sevdiğim aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Yaprak YILMAZ

1. ÖZET

Yenidoğan dönemindeki bakım olanaklarının iyileşmesi ile preterm yeni doğanların prognozunda önemli gelişmeler olmasına rağmen, preterm doğum, perinatal mortalite ve morbiditeyi etkileyen önemli bir faktördür. Multifaktöryel doğası nedeni ile preterm doğum patogenezinde rol oynayan mekanizmalar halen aydınlatılamamıştır. Gebeliğin mekanizması tam olarak açıklanamamış olmakla beraber tüm veriler anne ile fötüs arasındaki matriks metabolizmasında rol oynayan pro ve anti-inflamatuar sitokinlerin ve reseptörlerinin önemine dikkat çekmektedir. Proinflamatuvar sitokin ailesi üyelerinden TNF- α ve IL-1'in işlevini göz önüne alarak çalışmamızda 100 preterm ve 101 term yenidoğan ve annesinden genomik DNA örnekleri elde edilmiştir. PZR-RFLP analizi ile TNF- α (-238 G/A, -308 G/A), IL1- α (4845 G/T) ve IL-1 β (-511 C/T) genotipleme gerçekleştirilmiştir. TNF- α -238 G/A genotiplememizde çalışma popülasyonumuzda -238 AA genotipi saptanmamıştır. Bulgularımızda termde doğan bebeklerde -238 GA genotipi preterm bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Ek olarak maternal-fetal TNF- α -238 GA genotipi term olasılığını da arttırmaktadır ($p < 0.05$). TNF- α -308 GA ve AA genotipi term doğum yapan anne ve bebeklerde preterm grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,001$). Maternal-fetal genotip kombinasyonunun preterm doğum ile ilişkisi incelendiğinde ise; maternal-fetal TNF- α -308 GA heterozigotluğunun term doğum olasılığını artırırken; heterozigot annenin bebeğinin GG genotipine sahip olması preterm doğum olasılığını arttırmaktadır ($p < 0.01$). T allel sıklığı preterm doğum yapan anne ve bebeklerde daha yüksektir ($p < 0.001$). Maternal IL1- α 4845 GG ve GT genotiplerinin term doğuma yatkınlığı arttırdığı gözlenirken, fetal 4845 TT genotipi, anne genotipinden bağımsız olarak preterm doğum olasılığını arttırmaktadır ($p < 0.01$). IL-1 β -511 TT genotipi term bebeklerde preterm doğan bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. IL-1 β -511 CT genotipinde ise; preterm yatkınlık artarken, CC genotipi ile preterm arasında anlamlı bir ilişki

kurulamamıştır. Annelerde de IL-1 β -511 C/T polimorfizminin term veya preterm doğum ile ilişkilendirilememiştir. Maternal IL-1 β -511 TT genotipi ile fetal CT genotipi preterm yatkınlığı artırırken, maternal -511 CT veya -511 TT genotipi ile fetal TT genotipleri eşleştğinde term doğum olasılığı artmaktadır (p<0.01). Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin gen polimorfizmlerinin preterm doğuma yatkınlık belirteci ve risk tabakalandırılmasında kesin rolünün tanımlanabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: TNF- α (-238 G/A), TNF- α (-308 G/A), IL1- α (4845 G/T), IL-1 β (-511 C/T), preterm doğum

2. SUMMARY

Despite the significant improvements in the prognosis of premature neonates the preterm birth (PTB) is still one of the most common cause of perinatal morbidity and mortality. Due to its multifactorial nature the pathogenic mechanism still needs to be elucidated. Although parturition involves a complex and poorly understood molecular and biological interplay between the mother and fetus the evident molecular data strongly improves the importance of the pro- and anti-inflammatory cytokines and their receptor polymorphisms those linked to matrix metabolism. In view of the location and proposed biologic effect of TNF- α and IL-1, it would be prudent to further evaluate the association between maternal – fetal proinflammatory cytokine genotypes and PTB. The isolated genomic DNA from maternal and cord blood samples of 100 preterm and 101 term labors were used as a template. Restriction fragment size analyses were performed by examining digested PCR products for TNF- α (-238 G/A, -308 G/A), IL-1 α (4845 G/T) and IL-1 β (-511 C/T) genotypes. The results of our study revealed that; TNF- α -238 GA genotype in term neonates was significantly higher than the premature neonates ($p < 0.05$). Both maternal and fetal -238 heterozygosity was associated with term labor ($p < 0.05$). TNF -308 GA and AA genotypes were associated with term labor (mothers and neonates respectively $p < 0.05$, $p < 0.001$) and the incidence of term labor was significantly increased in TNF- α -308 GA genotype. However when the -308 GA carrier has a fetus with GG genotype the incidence of preterm labor increases ($p < 0.01$) 4845 T allele was significantly higher in preterm mothers and neonates (respectively $p < 0.001$, $p < 0.001$). The effect of maternal–fetal genotype for the pregnancy outcome reveals that maternal 4845 GG ve GT genotypes increase term labor incidence, while fetal 4845 TT genotype was a significant and independent risk factor for preterm birth ($p < 0.01$). The IL-1 β -511 TT genotype was significantly high in preterm neonates. The preterm labor risk was significantly increased in maternal -511 TT and fetal CT genotypes, while maternal -511 CT or TT genotypes have a -511 TT fetus, the incidence of

term pregnancy outcome increases ($p < 0.01$). Further research is needed to explore the usefulness of cytokine gene polymorphisms as markers of disease susceptibility (and for risk stratification) and to define their precise role in the pathogenesis of PTB.

Key words: TNF- α (-238 G/A), TNF- α (-308 G/A), IL-1 α (4845 G/T), IL-1 β (-511 C/T), preterm birth

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	iii
2. SUMMARY	v
3. KISALTMALAR VE SİMGELER	ix
4. ŞEKİLLER	xiii
5. TABLOLAR	xiv
6. GİRİŞ ve AMAÇ	1
7. GENEL BİLGİLER	3
7.1. Gebelik	3
7.2. Preterm Doğum	3
7.3. Preterm Doğum Riskini Arttıran Faktörler	4
7.4. Doğum Eyleminin Moleküler Mekanizması	7
7.4.1. Hücresel Regülasyon	7
7.4.2. Moleküler Regülasyon	9
7.4.3. Hormonal Regülasyon	10
7.4.3.1. Oksitosin	10
7.4.3.2. Östrojen-Progesteron	11
7.4.3.3. Adrenokortikotrop hormon (ACTH)	12
7.4.3.4. Relaksin	12
7.4.3.5. Endotelin-1	12
7.4.3.6. Prostaglandinler (PG)	13
7.5. Sitokinler	15
7.6. Sitokinlerin Fonksiyonları	16
7.7. Tümör Nekroze Edici Faktör (TNF)	17
7.8. TNF- α Gen Polimorfizmleri	19
7.8.1. Mikrosatellit markerlar	19

7.8.2. TNF- α genindeki tekli nükleotit polimorfizmleri	20
7.9. İnterlökin-1 (IL-1) Gen Ailesi	21
7.9.1. İnterlökin-1 α (IL-1 α)	25
7.9.2. İnterlökin-1 β (IL-1 β)	26
7.10. Preterm Doğum ve Sitokinler	26
8. GEREÇ VE YÖNTEM	29
8.1. Gereçler	29
8.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	29
8.1.2. Tampon ve çözeltiler	29
8.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	31
8.2. Yöntemler	32
8.2.1. Genomik DNA izolasyonu	33
8.2.2. Sitokin genotipleme	34
8.2.3. İstatistiksel analiz	42
9. BULGULAR	43
10. TARTIŞMA	56
11. SONUÇ	64
12. KAYNAKLAR	66

3. KISALTMALAR VE SİMGELER

aa	Aminoasit
ACTH	Adrenokortikotrop hormon
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz Çifti
BPD	Bipariyetal kafa çapı
Ca⁺²	Kalsiyum
CAD	Koroner Arter Hastalığı
CAMP	Siklik AMP
CRP	C reaktif protein
CSF	Koloni stimüle edici faktör
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	K3-etilendiamintetraasetik asit
EMR	Erken Membran Rüptürü
EtBr	Etidium Bromür
EtOH	Etil Alkol
G-CSF	Granülasit koloni stimüle edici faktör
GJ	Gap Junction
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör

gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü
IFN-β	İnterferon- β
IFN-γ	İnterferon- γ
IL-1	İnterlökin-1
IL-1α	İnterlökin-1 alfa
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-2	İnterlökin-2
IL-3	İnterlökin-3
IL-4	İnterlökin-4
IL-5	İnterlökin-5
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IL-13	İnterlökin-13
IL-1Ra	İnterlökin-1 Reseptör Antagonisti
kba	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisakkarit

LT	Lenfotoksin
M	Molarite
M-CSF	Monosit-makrofaj stimüle edici faktör
MgCl₂	Magnezyum klorür
MHC	Major Histokompetabilite kompleksi
MHZK	Myozin Hafif Zincir Kinaz
MIF	Migrasyon inhibe edici faktör
MIP-1α	Makrofaj inflamatuvar protein-1 α
MMPs	Matriks metalloproteinaz
NaCl	Sodyum Klorür
NEK	Nekrotizan enterokolit
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
PAF	Platelet aktive edici faktör
PAMPs	Patojen ile ilişkilendirilen moleküler patern
PGE	Prostaglandin E
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PGF	Prostaglandin F
PGHS	Prostaglandin sentaz
Pmol	Pikomol
PRR	Patojen Tanıma Reseptörü
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu

RA	Romatoid Artrit
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RDS	Respiratuar distress sendromu
ROP	Prematür retinopatisi
SDS	Sodyumdodesil sülfat
SLE	Sistemik Lupus Eritromatoz
SNP	Tekli nükleotit polimorfizmi
TACE	TNF- α dönüştürücü enzim
TEMED	Tetrametiletildiamin
TBE	Tris Borik asit Edta
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNF-α	Tümör Nekroze Edici Faktör- α
u	Ünite
μl	Mikrolitre

4. ŞEKİLLER

Şekil 7.1. GJ kanallarının gösterilmesi ve Konneksinin topolojik modeli.....	8
Şekil 7.2. TNF- α genindeki polimorfizmler.....	18
Şekil 7.3. IL-1 gen ailesinin 2. kromozom üzerindeki gösterimi. IL1A, IL1B ve IL1RN üzerindeki fonksiyonel SNP'ler	24
Şekil 8.1. TNF- α -238 G/A'nın 152 bç'lik DNA Parçasının <i>MspI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü	38
Şekil 8.2. TNF- α -308 G/A'nın 107 bç'lik DNA Parçasının <i>NcoI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü.....	39
Şekil 8.3. IL-1 α 4845 G/T'nin 229 bç'lik DNA Parçasının <i>SatI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü	40
Şekil 8.4. IL-1 β -511 C/T'nin 304 bç'lik DNA Parçasının <i>AvaI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü.....	41

5. TABLOLAR

Tablo 7.1. Preterm eylemin risk faktörleri	5
Tablo 7.2. Preterm eylemin medikal ve obstetrik nedenleri.....	6
Tablo 7.3. TNF- α gen polimorfizmi ve ilişkilendirilen hastalıklar.....	21
Tablo 7.4 IL-1 ailesi üyeleri ve isimlendirilmesi.....	22
Tablo 8.1. TNF- α -238G/A, TNF- α -308G/A, IL1- α 4845G/T ve IL1- β -511C/T genotiplemesinde kullanılan primer dizisi.....	35
Tablo 8.2. PZR protokolü.....	36
Tablo 8.3. RFLP analizinde kullanılan enzimler ve kesim paternleri.....	37
Tablo 9.1. Preterm ve term grubunun anne yaşı, gravida, para, gebelik haftası, doğum ağırlıkları ve cinsiyeti.....	43
Tablo 9.2. Örneklem alınan gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı.....	44
Tablo 9.3. Term ve preterm bebeklerin yoğun bakım izlemindeki sorunlarının gruplara göre dağılımı.....	45
Tablo 9.4. Fetal-maternal sitokin genotiplerinin dağılımı.....	46
Tablo 9.5. Fetal TNF- α 238G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	47
Tablo 9.6. Maternal TNF- α 308G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	48

Tablo 9.7. Fetal TNF- α 308 G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	48
Tablo 9.8. Maternal IL-1 α 4845 G/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	49
Tablo 9.9. Fetal IL-1 α 4845 G/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	49
9.10. Fetal IL-1 β -511 C/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	50
Tablo 9.11. Fetal-maternal TNF α -238G/A polimorfizminin term grupta dağılımı.....	50
Tablo 9.12. Fetal-maternal TNF α -238G/A polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	51
Tablo 9.13. Fetal-maternal TNF α -308G/A polimorfizminin term grupta dağılımı.....	51
Tablo 9.14. Fetal-maternal TNF α -308 G/A polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	52
Tablo 9.15. Fetal-maternal IL-1 α 4845 G/T polimorfizminin term grupta dağılımı.....	52
Tablo 9.16. Fetal-maternal IL-1 α 4845 G/T polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	53
Tablo 9.17. Fetal-maternal IL-1 β -511C/T polimorfizminin term grupta dağılımı.....	53
Tablo 9.18. Fetal-maternal IL-1 β -511 C/T polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	54
Tablo 9.19. Fetal haplotip analizi.....	54

6. GİRİŞ ve AMAÇ

Preterm eylem gebelerin son adetinin ilk gününden itibaren 20-37. haftalar arasında başlayan doğum eylemine, prematüre doğum ise doğum kilosundan bağımsız bu haftalar içinde olan doğumlara denir. İnsidansı popülasyonlara göre değişmekle beraber tüm doğumların %6-10'unu oluşturmaktadır. Anne açısından herhangi bir risk oluşturmamasına rağmen, preterm doğumlar ölümcül doğumsal malformasyonlar dışında yeni doğan ölümlerinin %75-90'nından sorumlu olup; neonatal morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerindedir (14, 45, 70).

Preterm doğum patogenezi ile ilgili bilgilerin çok az olmasına rağmen, birçok risk faktörü bulunmaktadır. Perinatal ve neonatal ölümleri engellemenin yanısıra prematüriteye bağlı gelişebilecek morbiditeyi önlemek amacıyla da erken doğumların engellenmesi fetal –maternal tıbbın önde gelen hedefidir (71).

İnflamatuar aktivitedeki artış doğumu stimule ederek preterm doğum insidansını arttırabilmektedir. Sitokinler bu olayda rol alan mediatörlerdir. Uterusta prostaglandin ve araşidonik asit sentezinin artışından sorumlu olan sitokinler aynı zamanda da kemotaktik etki nedeni ile proteaz sentezini tetikleyerek fetal membranların yırtılması ve servikal olgunlaşmaya bağlı olarak doğumu başlatabilir. Bu bulgulara inflammatuar yanıtta varyasyonların preterm doğum etyolojisindeki önemine işaret etmektedir (65).

Proinflammatuar mediatörler endotelden Tümör Nekroze Edici Faktör- α (TNF- α) ve İnterlökin -1(IL-1) etkisi ile salınarak vazodilatör (trombosit aktive edici faktör, prostaglandin) veya vazokonstrüktör etki yaparlar. TNF- α

proinflamatuar sitokinlerin yanı sıra antiinflamatuar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13, Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β)) ayrıca doğal sitokin inhibitörleri olan İnterlökin-1 Reseptör Antagonisti (IL-1Ra) üretimini de tetikler (17).

Monositler tarafından sentezlenen TNF- α 'nın düzeyi bireyler arasında oldukça önemli farklılıklar göstermektedir. Söz konusu bu farklılığa 6p21.3'de lokalize olan TNF- α genindeki mikrosatellit ve tekli ükleotid polimorfizmlerinin neden olduğu düşünülmektedir. Genin promotör bölgesinde lokalize olan -308 G/A ve -238 G/A polimorfizmleri transkripsiyonel düzeyde etki göstermeleri nedeni ile TNF- α ekspresyonunda önemli rol oynar (89).

Bakteriyel ürünlere (endotoksin) cevap olarak aktive olan makrofajlar tarafından yapılan IL-1 amnion, decidua ve myometriumda prostaglandin yapımını uyarmaktadır. Myometriyal hücrelerde ve amnion hücrelerinde özel bağlanma yerlerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (18, 20).

İnsanlarda IL-1 sitokin gen ailesi 2. kromozomun uzun kolunda lokalizedir ve 3 gen kodlar. Bunlar IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RA'dır. IL-1 α geninde -889 C/T ve 4845 C/T varyantları tanımlanmıştır. IL-1 β 'da 3 SNP tanımlanmıştır. 2 tanesi promotör bölgede (-511 C/T ve -31 C/T) ve diğeri (3954 C/T) kodlayıcı bölgededir. Bu değişimler IL-1'in çeşitli uyarana karşı yanıtında ekspresyon seviyesini etkilemesi nedeniyle ve çeşitli immün ve kronik inflammatuar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (21).

Bu çalışmada amacımız maternal-fetal TNF- α (-238 G/A, -308 G/A), IL-1 α (4845 G/T) ve IL-1 β (-511 C/T) genotiplerinin preterm doğumlarla ilişkisinin araştırılmasıdır.

7. GENEL BİLGİLER

7.1. Gebelik

Gebelik; fötüs tarafından eksprese edilen paternal (babaya ait) antijenlere karşı maternal (anneye ait) immün sistemin toleransı ile karakterize fizyolojik bir süreçtir. Normal gebelik süresince semiallojenik (yarı yarıya kendinden olan) embriyo maternal immün sistemin saldırılarından kaçabilecek stratejiler gerçekleştirir ve organize olurken, annenin dış etkenlere karşı verdiği immün yanıtı etkilemez. Maternal tolerans olarak adlandırılan bu durum ağırlıklı olarak plasenta ve burada yer alan trofoblast hücrelerinden kaynaklanmaktadır (12).

Maternal-föetal bağışıklık sistemini birbirinden ayıran seçici bir bariyer olarak işlev yapan plasenta; bazı antikorların anneden fötusa geçmesine izin verirken, enfeksiyon gibi zararlı ajanlara karşı koruyucu bir engeldir. Fötusun devamlılığını sağlayabilmek için hem fötal immünitinin tanınması, hem de maternal immünitinin baskılanması gereklidir. Söz konusu bu baskılanmada hem fötal ve hem de maternal faktörlerin rolü oldukça önemlidir. Bu baskılanma sürecinde oluşan değişikliğe bağlı olarak gestasyonel süreç etkilenerek “preterm” doğumları tetikleyebilmektedir (53, 68, 82).

7.2. Preterm Doğum

Preterm eylem gebelerin son adetinin ilk gününden itibaren 20-37. haftalar arasında başlayan doğum eylemine, prematüre doğum ise doğum kilosundan bağımsız bu haftalar içinde olan doğumlara denir. İnsidansı

popülasyonlara göre değişmekle beraber tüm doğumların %6-10'unu oluşturmaktadır (14, 45, 70).

Preterm doğum anne açısından herhangi bir risk oluşturmamasına rağmen, ölümcül doğumsal malformasyonlar dışında yeni doğan ölümlerinin %75-90'nından sorumlu olup; neonatal morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerindedir. Yaşayan yeni doğanlarda ise respiratuar distres sendromu , intraventiküler kanama, bronko pulmoner displazi, nekrotizan enterokolit, patent duktus arteriozus, hiperbilirubinemi, retinopati ve neonatal sepsis görülen başlıca problemler olup; organların immatüritesinden kaynaklanmaktadır (71).

Preterm doğumlar spontan ya da endikasyonlu (iyatrojenik) olabilir. Spontan preterm doğumların, %40-45'i membranlar açılmadan preterm doğum eylemi veya %25-30'i preterm membran rüptürü şeklinde gerçekleşir (3). Maternal veya fetal komplikasyonlar nedeniyle gerçekleşen endikasyonlu preterm doğum oranı ise %30-35 olarak bildirilmektedir (3).

7.3. Preterm Doğum Riskini Arttıran Faktörler

Uzun yıllar süren çabalara karşın insanlarda doğum eylemini başlatan faktörler tam olarak anlaşılammıştır. Preterm eylemin risk faktörleri Tablo 7.1'de gösterilmiştir. Günümüzde, preterm eylemin birden fazla nedeni olduğu ve birden fazla mekanizma ile başladığı kabul edilmektedir (30).

Tablo 7.1. Preterm eylemin risk faktörleri

Majör Risk Faktörleri	Minör Risk Faktörleri
<ul style="list-style-type: none">➤ Çoğul gebelik➤ Dietilstilbestrole maruz kalma➤ Polihidramniyos➤ Uterus anomalisi➤ 32. haftada servikal dilatasyon >1 cm➤ İki den fazla 2. trimesterde kayıp➤ Önceden preterm doğum olması➤ Termde doğum fakat preterm eylem öyküsü➤ Gebelik sırasında abdominal cerrahi➤ 32. haftada serviksin <1 cm kısılması➤ Kokain kullanımı➤ Uterusta irritabilite	<ul style="list-style-type: none">➤ Ateşli hastalıklar➤ 12. haftadan sonra kanama➤ Geçirilmiş pyelonefrit öyküsü➤ Birden fazla 2. trimesterde kayıp➤ Sigara 10 tane/gün➤ İki den fazla 1. trimesterde kayıp

Preterm eylemin maternal ve obstetrik nedenleri de Tablo 7.2'de gösterilmiştir. Eğitim düzeyi, aylık gelir göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda, erken doğum ile düşük sosyoekonomik düzey arasında sıkı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (30).

Tablo 7.2. Preterm eylemin maternal ve obstetrik nedenleri

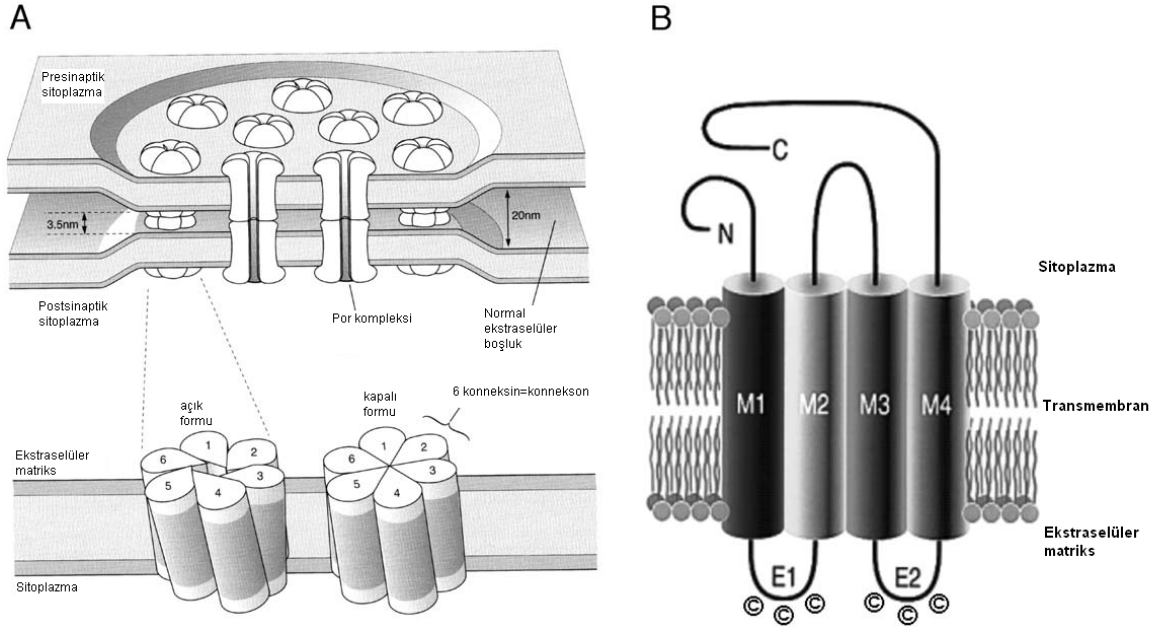
Maternal nedenler	Obstetrik nedenler
➤ Genitoüriner enfeksiyonlar	➤ Sık doğum
➤ Hipertansiyon	➤ Önceki gebeliklerde preterm doğum
➤ Kalp hastalığı	➤ Önceki gebeliklerde abortus anamnezi
➤ Böbrek hastalığı	➤ Gebelikte yetersiz veya aşırı kilo alımı
➤ Enfeksiyonlar	➤ Asemptomatik intrauterin enfeksiyonlar
➤ Şiddetli anemi	➤ Membranların rüptüre olması
➤ Hipertiroidi	➤ Plasenta patolojileri
➤ Hepatit	➤ Konjenital fetal anomaliler
➤ Yanık veya travma	➤ Polihidramnios veya oligohidramnios
➤ Cerrahi girişimler	➤ Multifetal gebelik
➤ Malnütrisyon veya obezite	➤ Servikal patolojiler
➤ Sigara-alkol içimi	➤ Uterin anomaliler

7.4. Doğum Eyleminin Moleküler Mekanizması

Doğum eyleminin başlamasında hücresel, moleküler ve hormonal olayların bileşkesi sonucu düzenlenen myometrial kontraktiliteden kaynaklanan uterus kasılmaları önemli rol oynamaktadır (8).

7.4.1. Hücresel Regülasyon

Gap Junction (GJ), iki hücre arasında silindir şeklinde bir kanal olup, ana yapısını konneksin adı verilen proteinler oluşturur. Madde ve elektrolitler hücre dışına çıkmadan diğer hücrelere geçebilirler. Bu yapıların bulunması, iki hücre arasındaki membran direncinin azalmasını ve arasındaki bağlantının rahat yapılabilmesini sağlar (9) (Şekil 1).



Şekil 7.1. A) GJ kanalları. Her bir hemikanal konneksin adı verilen 6 protein alt ünitesinden oluşur. B) Konneksinin topolojik modeli. Silindirler (M1-M4) transmembran domaini (81).

Uterusu oluşturan myometrial hücreler arasında nadir görülen GJ sayısı ve boyutları gebeliğin ilerlemesi ile artmaya başlar. Term ve preterm eylem esnasında GJ'ların myometriumda arttığı saptanmıştır (31). GJ, uterusun tek bir motor ünite şeklinde davranarak fötüs ve plasentanın doğum kanalından atılmasını sağlar. Terme yakın görülen ve Braxton Hicks kontraksiyonları olarak adlandırılan kontraksiyonların GJ oluşumu tamamlanan alanlardan kaynaklandığı bildirilmiştir. Yapılan in-vitro çalışmalarda, uterus örneklerinde östrojen/progesteron oranındaki artışla ve ortama prostoglandinlerin eklenmesi ile GJ oluşumunun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada prostoglandin sentez inhibitörlerinin dokuya eklenmesi ile GJ oluşumunun durduğu gösterilmiştir (60). GJ'larının oluşması, permeabilitesinin değişmesi, GJ'ların yıkılması gibi kontrol

mekanizmaları ile myometriyumun gebelik boyunca gevşek kalması veya doğum eyleminde kasılması sağlanmaktadır (8).

7.4.2. Moleküler Regülasyon

Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) düz ve çizgili kasta kontraktileti düzenler. Düz kasta kalsiyum konsantrasyonu; hücre membranı, sarkoplazmik retikulum ve mitokondri tarafından düzenlenir. Kalsiyum hücre içine voltaj veya reseptöre bağlı kanallar yolu ile girer. Hücre içinde ise sarkoplazmik retikulundan salınır. Hücre içinde Ca^{+2} 'un artışı ile kalsiyum-kalmodulin kompleksi oluşur ve bu kompleks myozin hafif zincir kinaz (MHZK) enzimine bağlanarak enzimi aktive eder. Fosforlanan myozin aktin ile birleşerek aktomyozin kompleksini oluşturur. Aktin, myozinin ATPaz aktivitesini açığa çıkararak kasta kontraksiyon meydana getirir. Defosforile olmuş myozin ise aktin tarafından tanınmayacağından aktin-myozin bağı kopar, kas gevşer (62).

Bazı hormon ve ilaçlar, myometriumdaki moleküler yapıya etki ile kasta kasılma ve gevşemeye neden olmaktadır. Örneğin: Oksitosin, hücre zarında " Ca^{+2} - Mg^{+2} -ATP'az enzimi"ni inhibe ederek hücre içi Ca^{+2} 'u arttırmaktadır. Relaksin ise hücre içi cAMP'i aktive ederek hafif zincir kinazı inhibe eder ve hücre içi Ca^{+2} 'u azaltır (62).

7.4.3.Hormonal Regülasyon

Gebeliğin erken dönemlerinde oluşan uzun süreli, düşük amplitudlu kontraksiyonlar, aktif eylem başladığında kısa süreli ve yüksek amplitudlu kontraksiyonlara dönüşür. Kontraksiyon tipindeki farklılaşma doğumun başlamasındaki anahtar olay olarak kabul edilmektedir. Eylemde kontraksiyonların başlaması ve sürdürülmesindeki hormonal faktörler önemli rol oynar (62).

7.4.3.1. Oksitosin

Oksitosin, östrojenlerin etkisi ile desidua ve koryonda sentez edilir. Oksitosin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu ve MHZK fosforilasyonunu artırarak kontraktiletiyi artırır. Ayrıca hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını başlatır ve sarkoplazmik retikulumun Ca^{+2} depolamasını inhibe eder. Böylece aktin-myozin ilişkisini uzatarak kas kasılmasının artırır. Hücre membranındaki Ca^{+2} - Mg^{+2} -ATPaz enzimi hücre membranı boyunca Ca^{+2} 'un geriye transportunu sağlar. Oksitosin bu enzimi inhibe eder ve kontraktiletiyi artırır. Oksitosin, decidua ve myometriyumda prostaglandin sentezini uyarır. Oksitosin, decidual ve myometriyal dokularda Prostaglandin E (PGE) ve Prostaglandin F (PGF) yapımını artırır. Serviksin açılması, oksitosinin deciduadaki prostaglandin sentezini uyarmasına bağlıdır (8).

Endojen oksitosinin salgılanma zamanı veya erken eylemin başlatıcısı olarak rolü kesin tanımlanmamıştır. Oksitosin salgısının pulsatil olması ve hormon düzeyinin ölçülmesinin zorluğu, oksitosinin rolünün tam olarak belirlenmesini güçleştirmektedir (8).

7.4.3.2. Östrojen-Progesteron

Progesteronun preterm doğum riskini azaltabileceği birçok çalışmada saptanmasına rağmen progesteronun etki mekanizmaları net bilinmemektedir (8).

Progesteron gebe uterusu da dahil olmak üzere birçok organda düz kasları gevşetir. GJ, hücreler arası iletişim, doğuma sebep olan koordineli uterus kas aktivitesinin ilerlemesi için önemlidir. Progesteron hücreler arası GJ oluşumunu önleyerek oksitosinin myometriyum üzerindeki etkisini bloke eder (57).

Östrojenler eylemin başlatılmasında doğrudan etkili olmamakla beraber GJ proteinlerinin oluşumu, oksitosin reseptörlerinin artması, uterusun oksitosine duyarlanması ve serviksin olgunlaşmasında rol oynamaktadır (65).

Myometriyal hücrelerde progesteronun azalan etkisi östrojen etkisinin dominant hale gelmesine sebep olur. Östrojen GJ yapımına ek olarak myometriyumda hem kendi hem de oksitosin reseptörlerinin sayısını artırır. Artan lipaz aktivitesine bağlı araşidonik asit salınımını ve prostaglandin biyosentezini uyarır. Hücre içi Ca^{+2} bağlanmasını ve myozinin fosforilasyonunu artırır. Östrojen hipotalamus–hipofiz düzeyinde etki yaparak oksitosin sentezinin artmasına ve dolaşıma oksitosin salınımına yol açar (65).

7.4.3.3. Adrenokortikotrop hormon (ACTH)

Anoksi, ftste stres oluşturup ACTH ve katekolamin salgılanmasını stimüle ederek doğum ağrılarını başlatmaktadır (8).

7.4.3.4. Relaksin

Primer olarak korpus luteumda yapılan bununla birlikte myometriyum, decidua ve plasenta tarafından da sentezlenebilen ovaryan kaynaklı bir hormondur. Yapı olarak insülin ve insüline benzeyen büyüme faktörlerine benzer. Birinci trimesterde relaksin düzeyleri çok yüksektir. Daha sonra tüm gebelik boyunca maternal serumda saptanabilir boyutlarda kalmaktadır. Doğumdan sonra süratle azalmaktadır. Relaksin özellikle ilk trimesterde uterin aktiviteyi bloke etmede ve gebelik boyunca myometriyumun sessiz kalmasını sağlamada progesteron ile sinerjik görev yapmaktadır. Ayrıca oksitosin salınımını da baskılar (8).

7.4.3.5. Endotelin-1

Gebeliğin uyardığı hipertansiyon etyolojisinde rol oynayan kuvvetli vazokonstrüksiyon yapan maddelerdir. Kuvvetli bir uterotonin olan endotelin-1 gebe olmayan uterustan alınan myometriyum bantlarında kuvvetli kasılma yapar. Bu etki hücre içi depolardan Ca^{+2} salınması ya da hücre içerisine Ca^{+2} girişini hızlandırarak olmaktadır (8).

7.4.3.6. Prostaglandinler (PG)

Prostaglandinler insan f3tal membranlarında (amnion ve koryon) ve deciduada sentezlenir. Servikal yumuşama, membranların yapısında değişiklik ve myometrium kasılmasında etkilidir. Myometrial kontraksiyonlar 3ncesinde amnion sıvısında prostaglandinler artar ve doğumda ise koryon ve amnion sıvısında prostaglandin sentaz (PGHS) aktivitesi artar (35).

Prostaglandinler h3cre içindeki Ca^{+2} miktarını arttırarak myozin hafif zincir kinaz enzimini aktive eder ve uterusu d3z kas kasılmasını ind3kler. Ayrıca kollejenazların, proteazların ve GJ miktarını arttırır. Sonuç olarak serviks olgunlaşması ve membranın r3pt3r3n3 sağlar, uterus kontraksiyonlarını arttırır. Prostaglandin inhibit3rleri preterm doğumu 3nler ve gebeliği uzatır (8, 35).

Lokal olarak progesteronun azalması, 3strojen/progesteron oranının değişmesi, fiziksel ve kimyasal stresler gibi nedenlerden dolayı lizozomlardan enzim salınımı olur ve prostaglandin sentezi artar. Ayrıca serviksin gerilmesi, 3strojenler ve oksitosin de prostaglandin sentezini uyarmaktadır. Bazı sitokinler prostaglandin yapımını attırarak, kontraktiletiyi sağlarlar. Servikal olgunlaşma ve membran r3pt3r3n3 oluşturarak doğum eyleminin başlamasında etkilidirler (8). Bu sitokinler;

a) İnterl3kin-1 (IL-1): Bakteriyel 3r3nlere (endotoksin) cevap olarak aktive olan makrofajlar tarafından yapılan bir sitokindir. IL-1 amnion, desidua ve myometriumda prostaglandin yapımını uyarmaktadır. Myometriyal h3crelerde ve amnion h3crelerinde 3zel bağlanma yerleri g3sterilmiştir (71).

b) Tümör Nekroze Edici Faktör (TNF): Aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanır ve IL-1 ile aynı özelliklere sahiptir. TNF, bakteriyel ürünlere cevap olarak insan desiduası tarafından sentez edilebilir. Normal gebelerin amnion sıvılarında olmamasına karşın, intraamniotik enfeksiyonu olan ya da doğum eylemi erken başlamış olan gebelerin amnion sıvılarında bulunur. Gebe hayvanlara sistemik ya da intrauterin olarak TNF uygulandığında doğum eylemini başlatır. İnsan amnion, decidua ve koryon dokusunda prostaglandin sentezinin başlamasından sorumludur (71).

c) İnterlökin-6 (IL-6): Enfeksiyon ve doku hasarına cevap olarak salgılanan önemli bir mediatördür. Fibroblastlar, makrofajlar, endotel hücreleri, keratinositler, endometriyal stromal hücreler tarafından salgılanabilirler. Özellikle IL-1, TNF ve interferonlar IL-6 salgılanmasını uyarırlar. Amnion sıvısında termde fazla miktarlarda bulunurlar (71). TNF-2 alleline sahip olan gebelerde bakteriyel vajinozis ve preterm insidansının arttığı gösterilmiştir (58).

Goepfert ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, termde doğum yapanlara göre 35. haftadan önce preterm doğum yapan hastaların, 24. gebelik haftasında servikal IL-6 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bakteriyel vajinososis ile birlikte artmış IL-6 düzeylerinin anlamlı olmadığı bildirilmiştir (35).

Paternoster ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, preterm doğum yapan gebelerin 24. gebelik haftasında servikal IL-6 ve serum ferritin düzeyleri yüksek bulunmuştur (11,66).

d)İnterlökin-8 (IL-8): Nötrofiller ve T hücreleri üzerine kemotaktik etkili olan ve onları aktive eden bir sitokindir. Enfeksiyon olsun ya da olmasın hem term hem

de preterm doğumlarda amnion sıvısında yüksek konsantrasyonda bulunur. Progesteron koryodesidual explantlardan IL-8 yapımını inhibe eder. Antiprogesterinler ise IL-8 yapımını stimüle eder. Serviksin olgunlaşması üzerine etkilidir (8,38).

e)Koloni Stimulan Faktör (CSF): Preterm eylem ve intraamniotik enfeksiyonlarda amnion sıvısında yüksek düzeylerde bulunur. Muhtemel görevlerinden biri desidual makrofajların proliferasyonunu sağlamak ve fonksiyonlarını düzenlemektir (8).

f)Platelet Aktive Edici Faktör (PAF): PAF amnion sıvısında PGE₂ sentezini uyarır, ayrıca direkt olarak myometrial kasılmaları uyarmaktadır. PAF asetil hidrolaz tarafından inaktive edilir. IL-1 ve TNF desidual makrofajlardaki asetil hidrolaz enzimini bloke ederek PAF salgısını artırırlar (8).

7.5. Sitokinler

İmmün sistem hormonları olarak da tanımlanan sitokinler; uyarıcı etkisi ile immün ve non-immün hücrelerden sentezlenerek üretildikleri hücreler üzerinde (otokrin etki) veya yakınındaki diğer hücreler (parakrin etki) üzerinde etkili olabildikleri gibi sistemik etki gösterebilen medyatörlerdir.

Glikoprotein yapısındaki söz konusu bu medyatörlerden lökosit kemotaksisini tetikleyenler kemokin, hücreler arası uyarıcı veya baskılayıcı uyarılar taşıyanlar ise interlökin (IL), olarak adlandırılır. Fibroblast, epitel hücreleri, dendritik hücreler, keratinositler gibi birçok hücreden salgılanır (9, 10, 39, 64).

7.6. Sitokinlerin Fonksiyonları

Sitokinlerin fonksiyonlarını dört ana başlık altında toplamak mümkündür (9, 39, 41). Bunlar;

1. Doğal immüniteye aracılık edenler

- Tip 1 interferon
- TNF
- IL-1
- IL-6
- IL-8

2. Lenfosit aktivasyonu, gelişimi ve farklılaşmasında etkili olanlar

- IL-2
- IL-4
- TGF- β

3. İltihabi hücreleri aktive edenler

- İnterferon- γ (IFN- γ)
- Lenfotoksin (LT)
- IL-5
- Migrasyon inhibe edici faktör (MIF)

4.Hematopoezisi uyaranlar

- IL-3
- Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)
- Monosit-makrofaj stimüle edici faktör (M-CSF)
- Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)
- IL-7 (9,39,41)

7.7. Tümör Nekroze Edici Faktör (TNF)

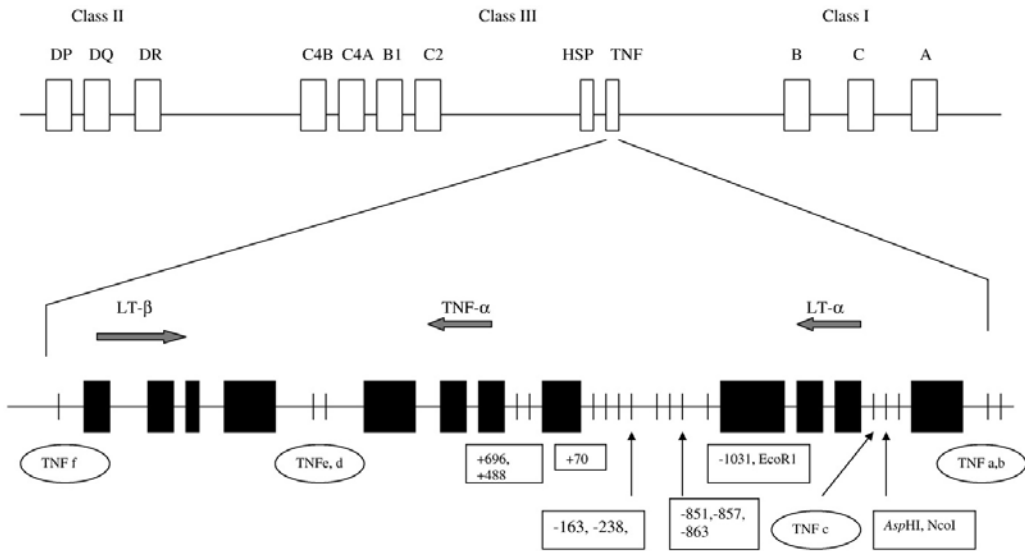
TNF- α geni 6p21 üzerinde lokalizedir. Major histokompatibilite kompleksi (MHC) class III bölgesinde yaklaşık 250 kilobazlık HLA-B lokusunun sentromerik bölgesinde ve 850 kilobazlık HLA-DR'nin telomerik bölgesinde bulunmaktadır. TNF- α 233 aminoasitten oluşur ve genin 4 ekzonu bulunur (şekil 7.2) (89).

Geniş proinflamatuvar aktivitesiyle güçlü bir sitokindir. Monositler/makrofajlar tarafından üretilirler. Buna ek olarak T ve B hücrelerinden de önemli ölçüde sentezlenirler (90). TNF'in lokal hücre sel etkileri; nötrofillerin endotel hücrelerine tutunmaları ve degranülasyonu, fagositoz aktivasyonu ve interselüler adezyon molekülü (ICAM-1) ekspresyonunda artış olarak sıralanabilir (24).

TNF'nin kaşeksi, infeksiyonlar, organ transplant reddi ve otoimmün hastalıklarda sistemik etkileri olduğu belirtilmiştir (85). TNF'i uyaran endojen ve ekzojen faktörler vardır. Birçok bakteri tipi ve bakteri lipopolisakariti (LPS)

TNF- α üretimini indüklerken, IL-1 ve interferon- γ varlığında da TNF aktivitesinde artış görülür (17).

TNF; α ve β olmak üzere biyokimyasal olarak farklılık gösteren iki formda sentezlenmektedir. TNF- α , uyanılmış makrofajlardan ve aktive T hücrelerinden, TNF- β ise sitotoksik T hücrelerinden salgılanmaktadır. TNF, etkisini hedef hücrelerin membranlarında bulunan yüksek affiniteli reseptörler üzerinden gösterir (85).



Şekil 7.2 TNF- α genindeki polimorfizmler (26)

TNF- α membrana bağlı 26 kDa molekül olarak üretilir. 17 kDa'lık aktif TNF- α molekülü enzimatik ayrılma ile çözülerek serbest kalır. Enzim

metalloproteinaz disintegrin ile karışmıştır ve TNF- α converting enzim (TACE) denir (26).

TNF- α , makrofajlardan IL-1 ve PGE₂; fibroblastlardan interferon- β (IFN- β) ve birkaç hücre tipinden granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) üretimini artırır.

TNF- α vasküler endotelyumda adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak immün hücreleri serbest bırakır. Nötrofiller ve makrofajlar özellikle doku hasarı ve enfeksiyon olan bölgeye giderler. Yüksek miktarlarda TNF- α üretimi bakteriyal endotoksinler tarafından indüklenen septik şokla ilişkilendirilmiştir (26).

7.8.TNF- α Gen Polimorfizmleri

7.8.1. Mikrosatellit markerlar

TNF lokusunda 5 mikrosatellit tanımlanmıştır. Bunlar TNF-a, TNF-b, TNF-c, TNF-d, TNF'dir. TNF-a ve TNF-b GT ve GA tekrarlarından oluşurlar. TNF-c GA tekrarlarından oluşur. TNF-d ve TNF-e GA ve GA-benzeri tekrarlar içerirler (43).

7.8.2. TNF- α genindeki tekli nükleotit polimorfizmleri (SNPs)

TNF- α geninde -1031 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/A), -851 (C/T), -419 (G/C), -376 (G/A), -308 (G/A), -238 (G/A), -162 (G/A), -49 (G/A) bölgelerinde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu varyantlar arasında TNF- α ekspresyonunu doğrudan etkileyen polimorfizm ise; -308 G/A ve -238 G/A'dır (26).

TNF- α geninde meydana gelen SNP'lerin TNF- α üretiminin düzenlenmesi açısından önemi vardır. TNF- α 'daki polimorfik bölgeler transkripsiyon faktörlerinin bağlanacağı DNA motiflerinin olduğu bölgeye karşılık gelir (26).

MHC haplotiplenmesinde TNF bölgesinde yapılan analizlerde -308 G ve -238 G haplotipinin düşük miktarda TNF- α üretilmesiyle ilişkili olduğu; -308 A ve -238 A allelinin yüksek miktarda TNF- α üretilmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (26).

TNF- α gen polimorfizmi veşkillendirilen hastalıklar ise tablo 7.3'te gösterilmiştir (26).

Tablo 7.3. TNF- α gen polimorfizmi ve ilişkilendirilen hastalıklar

- Paraziter, bakteriyal ve viral enfeksiyonlar
- Sistemik lupus eritromatoz (SLE)
- Romatoid artrit (RA)
- Ankilozan spondilit
- Transplantasyon
- Kanser- Non-Hodgkin lenfoma
- Koroner arter hastalıkları (CAD)

7.9. İnterlökin-1 (IL-1) Gen Ailesi

Önceleri endojen pirojen, lenfosit aktive edici faktör ve katabolin olarak bilinen IL-1 fibroblast, endotel hücreleri, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından yapılsa da özellikle makrofajlar tarafından sentezlenir. İmmünolojik reaksiyonların ve inflamasyonun başlaması için önemli bir medyatördür.

IL-1, güçlü inflamatuvar özellikleriyle birçok hücre tipini aktive edebilen multifaktöriyel bir sitokindir. IL-1'in geniş biyolojik özellikleri birçok farklı gen regulasyonunda rol oynamasından kaynaklanmaktadır (20). IL-1 immün

regülasyonu ve inflamatuvar süreçte sitokinler, kemokinler, nitrikoksit sentetaz ve matriks metalloproteinazların (MMPs) ekspresyonunu indükler (7).

Çeşitli proinflamatuvar medyatörler IL-1 sitokinlerinin transkripsiyonuna sebep olmaktadır. Bunlar patojen ile ilişkilendirilen moleküler protein (PAMPs), LPS ve proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IFN γ , IFN β ve IL-1 β 'dir. IL-1 sitokinleri için reseptörler yapısal olarak patern tanıma reseptörleri (PRR) ile ilişkilidirler. Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi LPS ve diğer PAMPs'ları tanırlar (7).

IL-1 sitokin ailesi, IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra), IL-18, IL-1F5-10 ve IL-33'den oluşmaktadır. Sitokinlere verilen isimler tablo 7.4'de listelenmiştir (7, 79).

Tablo 7.4. IL-1 ailesi üyeleri ve isimlendirilmesi (21).

Yeni Adı	Adı	Özelliği
IL-1F1	IL-1 α	Agonist
IL-1F2	IL-1 β	Agonist
IL-1F2	IL-1Ra	Reseptör antagonisti
IL-1F4	IL-18	Agonist
IL-1F5	FIL-1 δ	Anti-inflamatuvar
IL-1F6	FIL-1 ϵ	Agonist
IL-1F7	IL-1H4	Anti-inflamatuvar
IL-1F8	IL-1H2	Agonist
IL-1F9	IL-1 ϵ	Agonist
IL-1F10	IL1-Hy2	Reseptör antagonisti(?)
IL-1F11	IL-33	Agonist

2. kromozomun uzun kolu (2q) üzerinde konumlanan IL-1 α , IL-1 β ve IL-1Ra genleri (şekil 7.3), bakteri hücre duvarı komponentleri, sitokinler, ve iltihabi medyatörler gibi çevresel sinyaller yoluyla transkripsiyonel olarak regüle edilir (21).

IL-1 α ve IL-1 β , agonist aktiviteye sahipken, IL-1Ra diğer iki IL-1 molekülüyle antagonist aktiviteye sahiptir. Aminoasit düzeyinde sadece %27 benzerlik göstermelerine rağmen; IL-1 α ve IL-1 β ortak biyolojik fonksiyonlara sahiptirler (21). IL-1 β , IL-1 α 'dan 10-50 kat daha yüksek düzeyde sentezlenir ve pro-inflamatuar özellikleri daha güçlüdür. IL-1 α , büyük oranda hücre membranı ile ilişkilidir ve nekroz; apoptozis gibi hücre devamlılığının bozulduğu durumlarda salınır. IL-1 β , inaktif öncül protein olarak sentezlenir, ve hücreden spesifik proteinaz IL-1 dönüştürücü enzim salınımıyla aktif forma dönüşür (84).

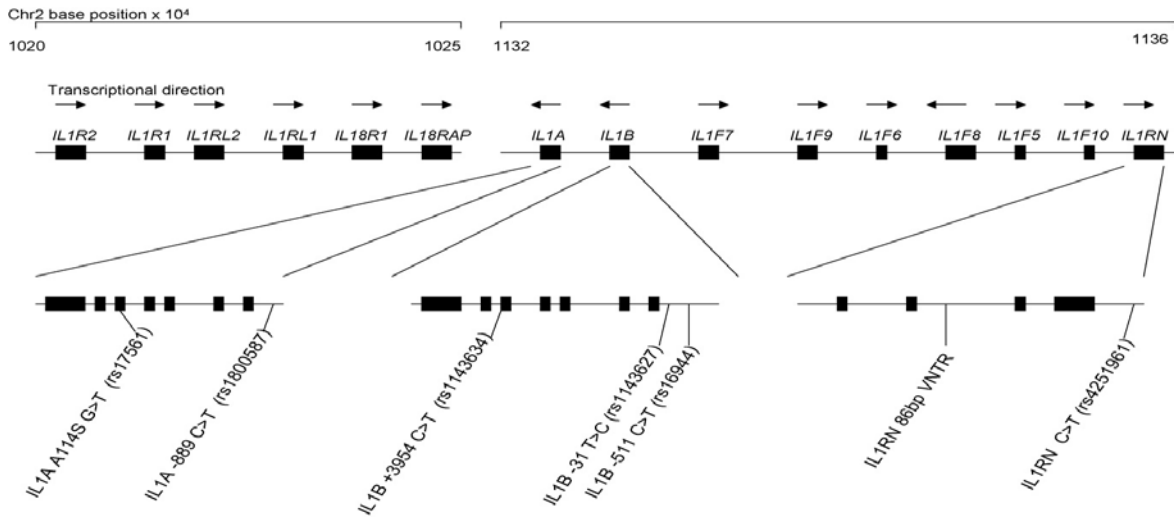
IL-1, hedef hücrelerdeki etkisini plazma membranında bulunan reseptörler üzerinden gösterir. Bunlar IL-R1 ve IL-R2'dir. IL-R1, özellikle T hücreleri ve fibroblastlarda dominant reseptördür. Ancak birçok hücre yüzeyinde de düşük sayıda bulunur. IL-1R2 ise nötrofil, monosit ve B hücreleri üzerinde bulunur (21).

IL-1 inflamasyonlu bölgelerde üretilen major sitokindir. Genel olarak antijenle uyarılmış makrofaj ve monositlerden salınır. Bununla beraber, nötrofiller, keratinositler, gingival ve dermal fibroblastlar, endotelial hücreler gibi birçok farklı hücre tipinden sentezlenebilir (18).

Doğal ve özgül immün cevapta rol oynayan antijen sunan hücreler, T hücreleri ve B hücreleri direkt ya da indirekt yolla IL-1 tarafından uyarılır. Benzer

şekilde T hücreleri de IL-1 salınımını yönlendirerek immün yanıtı şiddetlendirir ya da baskılar. İn-vitro koşullarda IL-1'in birçok hücre tipinde PGE₂ ve proteazların üretimini arttırdığı; kıkırdak ve kemik katabolizmasını indüklediği ve fibroblast proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (18, 20). IL-1α ve IL-1β, monosit ve fibroblastlardan büyük miktarlarda IL-6, TNF-α, prostoglandin E₂, matriks metalloproteinazları gibi medyatörlerin üretimine neden olur. Bu medyatörlerin üretimi kollajen degradasyonuna yol açar (20).

IL-1 kendi sinyalini güçlendirmek için başka hücrelerden de IL-1 salınımını tetikler. IL-1 aktivitesi özgün inhibitörü IL-1Ra dışında, kortikosteroidler, prostaglandinler, IL-4, IL-10 ve IL-11 gibi antiinflamatuvar sitokinler tarafından baskılanır (64).



Şekil 7.3 IL-1 gen ailesinin 2. kromozom üzerindeki gösterimi. IL1A, IL1B ve IL1RN üzerindeki fonksiyonel SNP'ler (80)

7.9.1. İnterlökin-1 α (IL-1 α)

IL-1 α 7 ekzonçermektedir. IL -1 β ileönemli homoloji göstermektedir. Plazma IL-1 α konsantrasyonu IL-1 β 'dan daha yüksektir. Bunun nedeni ise translasyonel ya da protein işlenmesi farklılıklarından daha çok transkripsiyonel düzeydeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (80).

IL-1 α da iki polimorfizm bulunmaktadır. Bunlar -889 C/T ve 4845 G/T'dir. IL-1 α 4845 G/T bölgesinde meydana gelen polimorfizm genin kodlayıcı bölgesindedir. Proteaz ayrılma bölgesine yakınlığı vardır. 112 ve 113. aminoasitler arasındadır ve pro IL-1 α 'yı olgun sitokine dönüştürür. G/T değişimi ile 114. bölgede Alanin amino asidi Serin amino asidine dönüşmektedir (29). Bu aminoasit dizisi değişimi IL-1 α 'da meydana gelen protein konformasyonunu, biyolojik fonksiyonlarını, proteinin reseptör affinitesini yada yarı ömrünü değiştirir. 4845 T polimorfizmi genin kodlayan bölgesi içindedir. Bu polimorfizm pro-IL-1 α 'ı olgun sitokine dönüştüren 112 ve 113. aminoasitler arasındaki kalpain benzeri proteazın kesim yaptığı bölgeye oldukça yakındır (48).

IL-1 α -889 C/T polimorfizmi transkripsiyonel düzenleyici bölgede meydana gelmiştir. 4845 G/T için marker görevindedir ve minör allelin pre-IL-1 α işlenmesinde IL-1 α salınımına yardımcı olduğu gösterilmiştir (76).

7.9.2. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

7.5 kb'lık gen kodlar. 7 ekzonu vardır, distal ve proksimal promotörler ile regülasyonu yapılır. IL-1 β 'da -511 C/T ve -31 T/C meydana gelen iki yaygın polimorfizmdir. 3954 C/T ise; kodlayıcı bölgede meydana gelen tek varyanttır.

IL1- α ve IL-1 β yapsal olarak birbirleriyle ilişkilidirler ve aynı reseptöre farklı affinitelerde bağlanırlar. IL1- α primer olarak hücrelerle ilişkilidir. Sitolzde hücrelerin plazma membranında bolca bulunur. IL-1 β IL-1'den ana sentezlenen formdur (48).

7.10. Preterm Doğum ve Sitokinler

Sitokin ve kemokin ağı gebelik boyunca homeostazisi devam ettirir. Güçlü inflammatuar yanıt sitokinler ve kemokinler aracılığıyla gerçekleşir. Gebeliklerde preterm doğumlar gibi komplikasyonlar gerçekleşebilmektedir. Sitokinler otokrin ve parakrin mekanizmalar ile gebeliği düzenlerler. Gebelik; geçici semiallojenik grafta maternal immün adaptasyonu olarak addedilir (87).

Gebeliğin erken aşamalarında Th₂ sitokinleri progesteron üretiminin artmasına neden olur. Progesteron Th₂ sitokin sekresyonunu arttırırken (IL-10 ve IL-6) Th1 ve proinflammatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-8, TNF α)üretilmesini azaltır. Pozitif feedback ile gebeliğin devamını sağlar. Gebeliğin sonlarına doğru bu denge Th1 sitokinlerine doğru kayar. Th1 sitokinleri proinflammatuar özelliktedir. Prematurite; antiinflammatuardan proinflammatuara doğru dengenin değişmesiyle meydana gelir (87).

Spontan preterm doğumların etyolojisinde infeksiyon ve inflammatuar yanıtın katkıda bulunduğu dair artmış kanıtlar vardır. İmmun yanıtta genetik yatkınlık faktörleri incelenmiştir.

Spontan preterm doğum ve SGA etyolojisinde proinflammatuar sitokinlerin genetik varyasyonlarının katkısı değerlendirildiğinde genotip-fenotip ilişkisinin çalışılması sitokinlerin konak yanıtında pleotropik etkileri nedeni ile kritiktir (28).

Intrauterin enfeksiyonlarda inflammatuar hücreler-nötrofiller epitel hücrelerden amniona doğru göç ederler ve çeşitli sitokinleri üretirler. Romero ve arkadaşları IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, koloni stimüle edici faktör, makrofaj inflammatuar protein1 α (MIP-1 α) ve platelet aktive edici faktör konsantrasyonlarını amnion sıvısında intrauterin infeksiyonu olan hastalarda çalışmışlardır (75).

IL-1 aktive olmuş monositler/ makrofajlar tarafından bakteriyal ürünlere yanıt olarak üretilir. IL-1 üretimi transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde regüle edilebilir. IL-1'in 2 alt tipi vardır. IL-1 α ve IL-1 β 2 farklı genin ürünüdürler. IL-1 β desidua ve plasental membrandan normal gebelik boyunca üretilir. Erken gebelikler gebe olmayan uterusla karşılaştırıldığında IL-1 β protein ve mRNA seviyeleri dokularda önemli artış gösterir (75, 87).

TNF- α , IL-1 ile benzer özellikler gösterir ve aktive olmuş makrofajlar ve diğer hücre tiplerinden salgılanır. TNF- α sitokin ~~ç~~ında gebelikte anahtar role sahiptir. Amnion sıvısında TNF- α 2. ve 3. trimester~~d~~ğere intraamniyotik infeksiyon yoksa tespit edilememiştir. Amniyon sıvısındaki TNF konsantrasyonu

intraamniyotik enfeksiyonu olan ve preterm eylemde enfeksiyon olmayanlara göre daha yüksektir (75).

Gebeliklerde enfeksiyon, proinflatuar sitokinlerden IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın amniyon sıvısı, myometrium, decidua, fetal membranlar ve maternal serumda seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Ancak 3. trimesterde enfeksiyon olmayan gebeliklerde de IL-1 β ve IL-8'in amnion, koryo-decidua ve myometriumda seviyelerinin arttığı görülmektedir. Bu durum, sitokinlerin doğum sürecinde enfeksiyon olmasına bakılmaksızın rolü olduğunu göstermektedir (15).

8. GEREÇ VE YÖNTEM

8.1. Gereçler

8.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Trizma Baz (*Sigma T6066*), Borik Asit (*Sigma B6768*), Asetik Asit (*Sigma A6283*) EDTA (*Sigma E5134*), NaCl (*Sigma S3014*), SDS (*Sigma S3014*), Proteinaz K (*Sigma P2308*), Fenol (*Sigma P4557*), Kloroform (*Sigma C2432*), İzoamilalkol (*Sigma I-9392*), Agaroz (*Sigma A5093*), Agaroz Wide Range (*Sigma A2790*), Agaroz (*Applichem A2114*), %100 EtOH (*Riedel-de Haën*), Primer (*Alpha DNA*), dNTP (*Roche 11814362001*), Taq DNA polimeraz (*Roche 11596594001*), MspI (HpaII) (*Fermentas ER0541*), NcoI (*Fermentas ER0571*), SmaI (Fnu4HI) (*Fermentas ER1642*), Aval (Eco88I) (*Fermentas ER0381*), MgCl₂ (*Sigma M1028*), DMSO (*Sigma D8418*), Amonyum persülfat (APS) (*Sigma A9164*), Akrilamid (*Sigma A9099*), Bisakrilamid (*Sigma M2022*), Orange G (*Sigma Q3756*), Etidium Bromür (10 mg/ml) (*Sigma E1510*), TEMED (*Sigma T9281*), 50 bç. DNA ağırlık belirleyici (*Fermentas SM0371*), pUC8 DNA ağırlık belirleyici (*Fermentas SM0301*), 6X yükleme boyası (*Fermentas R0611*)

8.1.2. Tampon ve Çözeltiler

Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler:

- **10mM Tris-1mM EDTA:**

Tris 25 ml 0,2 M Tris (242 g Trizma Baz + 1 L dH₂O;
(pH:8.0)

EDTA 1 ml 0,5 M EDTA (163,6 g EDTA + 1 L dH₂O;
(pH:8.0)

dH₂O 474 ml

- **1 M NaCl**

NaCl 1,45 g

dH₂O 25 ml

- **%10 SDS**

SDS 2,5 g

dH₂O 25 ml

- **Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1)**

Fenol 100 ml

Kloroform 96 ml

İzoamilalkol 4 ml

- **%100 EtOH**

- **Proteinaz K (10 mg/ml)**

Proteinaz K 100 mg

dH₂O 10 ml

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan çözeltiler:

- **%10 DMSO**

DMSO 10 ml

dH₂O 90 ml

- **25 mM MgCl₂**

- **10X Taq Buffer**

Agaroz Jel Elektroforezi:

- **0,5X TAE**

50X Tris-Asetat-EDTA Tamponu 20 ml

dH₂O 2 lt

- **Etidium Bromür**

Etidium Bromür 500 µlt

dH₂O 750 µlt

- **50 bç. DNA ağırlık belirleyici**

DNA marker	1 µlt
6X Yükleme boyası	1 µlt
dH ₂ O	5 µlt

- **Yükleme Tamponu**

Gliserol	55 ml
1X TAE	45 ml
Orange G	0,1 g

Poliakrilamid Jel Elektroforezi:

- **Akrilamid/Bisakrilamid (29:1)**

- **%10 APS**

APS	0,5g
dH ₂ O	5ml

- **5X TBE**

Trizma Baz	54 g
Borik Asit	27,5 g
0,5M EDTA	20 ml
dH ₂ O	1 lt

- **1X TBE**

5X TBE	200 ml
dH ₂ O	800 ml

8.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Kodak EDAS 290 görüntü analiz sistemi

Biorad yatay elektroforez tankı

Cleaver yatay elektroforez tankı

Biorad dikey elektroforez tankı

Biofuge stratos santifüj

Biofuge pico santrifüj
Nüve FN500 etüv
Nüve EN400 etüv
Boeco vorteks
Bioer XP Thermal Cyclers

8.2. Yöntemler

Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Etik Kurulu tarafından bilgilendirilmiş onay formu alınan 100 term, 101 preterm bebek ve anne katıldı. Çalışma örnekleri Eylül 2008-Mart 2010 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Ankara, Adana, Konya Uygulama ve Araştırma Merkezleri ile Sağlık Bakanlığı Etilik Zübeyde Hanım Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesinde toplandı.

Tek yumurta ikizi olan bebekler ve düşük doğum ağırlıklı olan bebekler çalışma dışı bırakıldı. Normal vajinal doğum ve sezaryen ile doğum ayırımı yapılmadı.

Doğumdan önceki annelerin klinik ve obstetrik takipleri (kaçıncı gebelik olduğu, yaşayan bebek sayısı, önceki gebeliklerdeki yaşadığı sorunlar), mevcut risk faktörleri (erken membran rüptürü, koryoamniyonit, preeklampsi, diabetes mellitus, gestasyonel diabetes mellitus, plasental yetmezlik) ve gestasyonel yaşları kaydedildi. Bebeğin doğum ağırlığı ve cinsiyeti not edildi. Doğumdan sonra yenidoğan yoğun bakım ihtiyacı gösteren term ve preterm bebekler yoğun bakımda kaldıkları sürece gelişen sorunlar (respiratuvar distress sendrom, sepsis, nekrotizan enterokolit vb.) yönünden takip edildi.

DNA izolasyonu gerçekleştirilerek kalıtsal faktörlerin incelenmesi amacıyla kan örneklemeleri için anneden 5 ml kan alınarak 0,072 ml %7.5 K3-etilendiamintetraasetik asit (EDTA) solüsyonu içeren standart tüpe konuldu.

Annenen kan alma işlemi hastadan tıbbi nedenlerle kan alınacağı bir zamana denk getirildi. Bebek çıkımı tamamlandıktan hemen sonra steril şartlarda cerraha verilmiş olan enjektörle umbilikal kord'dan 5 ml kan örneği alınması istendi. 0,072 ml %7.5 EDTA solüsyonu içeren standart tüplere tüpe konuldu. Alınan kan örnekleri soğuk zincir şartlarına uyularak DNA değerlendirilmeleri yapılmak üzere Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına götürüldü.

8.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

1. 500 µl'lik kan örnekleri 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konulur.
2. Üzerlerine 750 µl Tris-EDTA solüsyonu eklenerek çok iyi karışması sağlanır. 12.000 rpm'de 3 dk santrifüjlenir.
3. Üst faz atıldıktan sonra 2. tur lizis tamponu ile bir kez daha yukarıda bahsedilen işlem tekrarlanır.
4. 3. ve 4. turlar için ise 500 µl Tris -EDTA solüsyonu eklenir ve 12.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenir.
5. 4. tur sonunda üst faz atılır ve her bir tüpe;
 - 300 µl Tris-EDTA,
 - 150 µl 1M NaCl
 - 150 µl %10'luk SDS
 - 100 µl Proteinaz Keklenir.
6. 37°C'de 1 gece bekletilir.

7. Her bir tüpe 450 µl Fenol -Kloroform-İzoamilalkol eklenir ve vorteks yapılır.
8. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında üst faz yeni tüplere aktarılır.
9. 800 µl %100'lik EtOH eklenir.
10. 3 saat -20°C'de bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir ve alkol fazı dökülür.
11. Alkolü tamamen uçurmak için tüpler kapakları açık bırakılarak 37°C'lik kuru blokta bekletilir.
12. DNA'lar 150 µl dH₂O çözülerek kullanılacakları güne kadar -86°C'de bekletilir.

8.2.2. Sitokin Genotiplemesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

TNF- α -238G/A, TNF- α -308G/A, IL1- α 4845G/T ve IL1- β -511C/T genotiplemesinde kullanılan primer dizileri tablo 8.1'de verilmiştir.

Tablo 8.1. TNF- α -238G/A, TNF- α -308G/A, IL1- α 4845G/T ve IL1- β -511C/T genotiplemesinde kullanılan primer dizisi

Polimorfizm	Primer Dizisi
Tnf- α -238G/A (2)	F 5'ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG 3' R 5'AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC 3'
Tnf- α -308G/A (59)	F 5'AGG CAATAG GTT TTG AAG GCC AT 3' R 5'TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3'
IL1- α 4845G/T (48)	F 5' ATG GTT TTA GAA ATC ATC AAG CCT AGG GCA 3' R 5' AAT GAA AGG AGG GGA GGA TGA CAG AAATGT 3'
IL1 β -511 C/T (46)	F 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3' R 5' GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT 3'

PZR koşulları	94°C'de 5 dakika	} 35 döngü
	94°C'de 30 saniye	
	54°C'de 45 saniye	
	72°C'de 1 dakika	
	72°C'de 7 dakika	

Çalışmamızda TNF- α -238G/A, TNF- α -308G/A, IL1- α 4845G/T ve IL1- β -511C/T polimorfik bölgelerinin analizinde uygulanan PZR yöntemi için örneklerin hazırlanması tablo 8.2'de verilmiştir. PZR ürünlerinin amplifikasyonu etidyum bromid (EtBr) ile boyanmış % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Tablo 8.2. PZR protokolü

PZR Master Mix	<u>TNF-α</u> <u>-238 G/A</u>	<u>TNF-α</u> <u>-308 G/A</u>	<u>IL-1α</u> <u>4845 G/T</u>	<u>IL-1β</u> <u>-511 C/T</u>
dH ₂ O	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l
10 X TaqBuffer	5 μ l (1X)	5 μ l (1X)	5 μ l (1X)	5 μ l (1X)
%10 DMSO	5 μ l (%8)	5 μ l(%8)	2.5 μ l(%8)	2.5 μ l(%8)
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l (2,5mM)	3 μ l (2,5mM)	-	-
dNTP (10 mM)	1 μ l (200 μ M/her bir dNTP)	1 μ l (200 μ M/her bir dNTP)	1 μ l (200 μ M/her bir dNTP)	1 μ l (200 μ M/her bir dNTP)
Primer“Forward”	1 μ l (10 pmol/ μ lt)	1 μ l	1 μ l (10 pmol/ μ lt)	1 μ l (10 pmol/ μ lt)
Primer“Reverse”	1 μ l (10 pmol/ μ lt)	1 μ l (10 pmol/ μ lt)	1 μ l (10 pmol/ μ lt)	1 μ l (10 pmol/ μ lt)
Taq DNA pol. (5u/ μ lt)	0.25 μ l- 1.25u	0.25 μ l- 1.25u	0.25 μ l- 1.25u	0.25 μ l- 1.25u
Genomik DNA	2.5 μ l 100-200 ng	2.5 μ l 100-200 ng	2.5 μ l 100-200 ng	2.5 μ l 100-200 ng

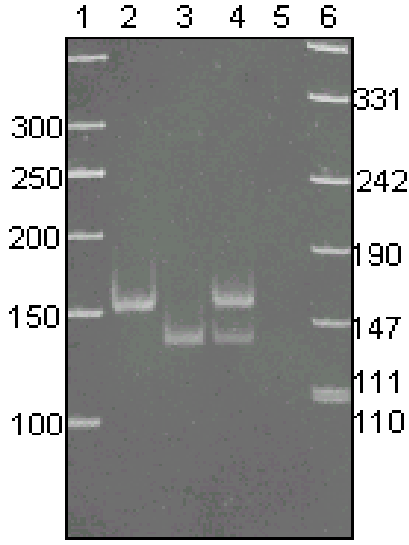
Restriksiyon Fragman Uzunluk Analizi (RFLP)

PZR ürünleri TNF- α -238G/A, TNF- α -308G/A, IL1- α 4845G/T ve IL1- β -511C/T için sırasıyla MspI, NcoI, SmaI, Aval kesim enzimleri kullanılarak kesilmiştir.

%12'lik poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülen restriksiyon enzim kesim ürünleri EtBr ile boyanarak, görüntülemesi Kodak EDAS 290 ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 'de kesim paternleri ile ilgili bilgi verilmektedir.

Tablo 8.3. RFLP analizinde kullanılan kesim enzim ve paternleri

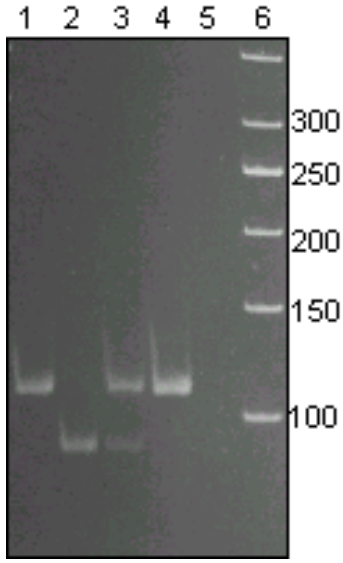
Polimorfizm	Kesim Enzimi	Kesim Paterni
TNF- α -238G/A	MspI	152 bp ürün G:19,133 A:152
TNF- α -308G/A	NcoI	107 bp ürün G:87, 20 A:107
IL-1 α 4845G/T	SatI	229 bp ürün G: 124,76,29 T: 153,76
IL-1 β -511 C/T	AvaI	304 bp ürün C: 190,114 T:304



TNF- α -238G/A

1. 50 bç. marker
2. PZR ürünü 152 bç.
3. GG 133,19 bç.
4. GA 152,133,19 bç.
5. Negatif Kontrol
6. Puc8 marker

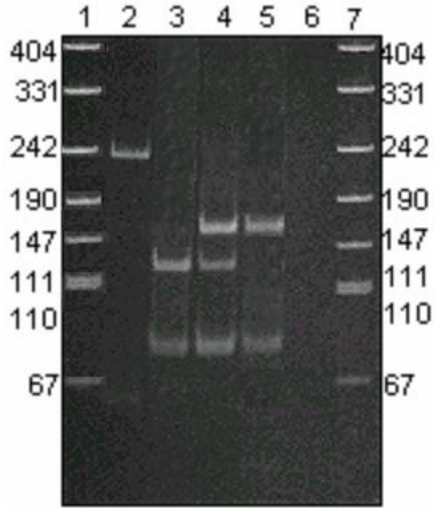
Şekil 8.1. TNF- α -238 G/A'nın 152 bç'lik DNA Parçasının *MspI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü. 1. kuyu, 50 bç DNA ağırlık belirleyici, 2. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (152bç.), 3. kuyu, *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilen GG genotipi (133bç. ve 19bç.), 4. kuyu, *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilen GA genotipi (152bç.,133bç.,19bç.), 5. kuyu negatif kontrol, 6. Kuyu DNA Puc8 ağırlık belirleyici.



TNF- α -308G/A

1. PZR ürünü 107 bç.
2. GG 87, 20 bç.
3. GA 107, 87, 20 bç.
4. AA 107 bç.
5. Negatif Kontrol
6. 50 bç. marker

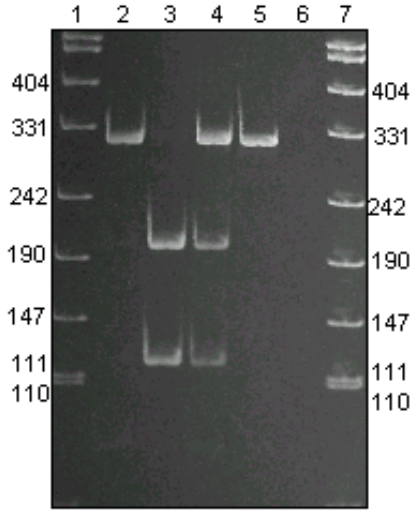
Şekil 8.2. TNF- α -308 G/A'nın 107 bç'lik DNA Parçasının *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü. 1. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (107bç.), 2. kuyu, *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesilen GG genotipi (87bç. ve 20bç.), 3. kuyu *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesilen GA genotipi (107bç.,87bç. Ve 20bç.), 4. kuyu, *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesilen AA genotipi (107bç.), 5. kuyu negatif kontrol, 6. Kuyu 50 bç DNA ağırlık belirleyici.



IL-1 α 4845 G/T

1. Puc8 marker
2. PZR ürünü 229 bç.
3. GG 124, 76, 29 bç.
4. GT 153, 124, 76, 29 bç.
5. TT 153, 76 bç.
6. Negatif Kontrol
7. Puc 8 marker

Şekil 8.3. IL-1 α 4845 G/T'nin 229 bç'lik DNA Parçasının *SatI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü. 1. Kuyu DNA Puc8 ağırlık belirleyici, 2. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (229bç.), 3. kuyu *SatI* restriksiyon enzimi ile kesilen GG genotipi (134bç., 76bç. ve 29bç.) 4. kuyu, *SatI* restriksiyon enzimi ile kesilen GT genotipi (153bç., 124bç., 76bç. Ve 29bç.) 5. kuyu *SatI* restriksiyon enzimi ile kesilen TT genotipi (153bç. Ve 76bç.), 6. Kuyu negatif kontrol, 7. Kuyu DNA Puc8 ağırlık belirleyici.



IL-1 β -511C/T

1. Puc8 marker
2. PZR ürünü 304 bç.
3. CC 190,114 bç.
4. CT 304, 190, 114 bç.
5. TT 304 bç.
6. Negatif Kontrol
7. Puc8 marker

Şekil 8.4. IL-1 β -511 C/T'nin 304 bç'lik DNA Parçasının *AvaI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %12'lik PAGE görüntüsü. 1. Kuyu DNA Puc8 ağırlık belirleyici, 2. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (304bç.), 3. kuyu *AvaI* restriksiyon enzimi ile kesilen CC genotipi (190bç., ve 114bç.) 4. kuyu, *AvaI* restriksiyon enzimi ile kesilen CT genotipi (304bç., 190bç., 114bç.) 5. kuyu *AvaI* restriksiyon enzimi ile kesilen TT genotipi (304bç.), 6. Kuyu negatif kontrol, 7. Kuyu DNA Puc8 ağırlık belirleyici.

8.2.3. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Varyansların homojenliği ise Levene testi ile analiz edildi. Parametrik testlerin ön şartlarının yerine gelmediği görüldüğünden söz konusu değişkenlere ilişkin iki grubun karşılaştırılması amacıyla Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar gözlem sayısı, ortalama±standart sapma ve ortanca değer olarak ifade edildi.

Genotipler ile çalışma grubu (term-preterm) arasındaki ilişkinin analizinde Pearson ki-kare testi veya çapraz tabloların frekans durumuna göre olabilirlik oran testi ve Binary Lojistik Regresyon analizi kullanıldı. Alleller ve çalışma grubu arasındaki ilişki, Fisher-Exact testi ile analiz edildi. İstatistiksel değerlendirmelere ilişkin sonuçlar n, % ve Odds oranı olarak ifade edilmiştir. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri seti SPSS programı (SPSS version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak değerlendirildi. Haplotip analizlerinde ise loglinear modellerden yararlanıldı.

9. BULGULAR

Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Hastanelerinde doğan, anne yanında ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinde izlenen 201 bebek ve annesi alındı. Çalışma grubu, 100 prematür ve 101 term yenidoğan ve annelerini kapsamaktadır. Grupların demografik özellikleri Tablo 9.1'de verilmiştir.

Tablo 9.1. Preterm ve Term grubunun anne yaşı, gravida, para, gebelik haftası, doğum ağırlıkları ve cinsiyeti

		Term n=101 n(%)	Preterm n=100 n(%)	p
Anne Yaşı (yıl)*		26.1±5,2 25,0	28.3±6.1 27,0	<0,05
Gebelik Haftası*		38,8±1,2 39,0	30,8±3.3 31,0	<0,001
Doğum Ağırlığı*		3314±416 3300	1551±628 1365	<0,001
Cinsiyet (kız/erkek)		58/43	54/46	=0,671
Gravida n (%)	1	37(46,3)	43(58,3)	=0,313
	2	44(61,1)	28(38,9)	
	3	13(43,3)	17(56,7)	
	4	5(41,7)	7(58,3)	
	5	1(25,0)	3(75,0)	
	6	1(50,0)	1(50,0)	
Para n (%)	1	80(54,8)	66(45,2)	=0,252
	2	14(40,0)	21(60,0)	
	3	6(37,5)	10(62,5)	
	4	1(33,3)	2(66,7)	

* Değerler ortalama ± standart sapma ve ortanca değer olarak verilmiştir.

Prematüre ve term kontrol grubu karşılaştırıldığında anne yaşı ($P<0.05$), gebelik haftası ve doğum ağırlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanırken ($p<0,001$), para, gravida ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık bulunmadı.

Tablo 9.2. Örneklem alınan gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı

	Term n=101, n(%)	Preterm n=100, n (%)	p
EMR	3(3,0)	48(48,5)	<0,001
Koryoamnionit	0(0,0)	13(13,1)	<0,001
Preeklamsi	5(5,0)	25(25,3)	<0,001
Diabetes Mellitus	3(3,0)	7(7,1)	=0,183
Plasental Yetmezlik	1(1,0)	11(11,1)	<0,01

Gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı Tablo 9.2'de verilmiştir. Gebeliklerdeki sorunların her biri bakımından prematüre grubundaki anneler term kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Erken Membran Rüptürü (EMR), koryoamnionit, preeklamsi ve plasental yetmezlik açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken diabetes mellitus açısından fark bulunmadı.

Tablo 9.3. Term ve preterm bebeklerin yoğun bakım izlemindeki sorunlarının gruplara göre dağılımı

	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p
Erken Neonatal Sepsis	0(0,0)	35(35,4)	<0,001
Geç Neonatal Sepsis	0(0,0)	32(32,3)	<0,001
BPD	0(0,0)	19(19,2)	<0,001
NEK	0(0,0)	14(14,1)	<0,001
ROP	0(0,0)	15(15,2)	<0,001
RDS	0(0,0)	50(50,5)	<0,001

Tablo 9.3'de term ve preterm bebeklerin yoğun bakım sorunları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Prematüre bebekler, klinik izlemlerinde erken neonatal sepsis, geç neonatal sepsis, Biparyetal kafa çapı (BPD), nekrotizan enterokolit (NEK), Prematür Retinopatisi (ROP) ve Respiratuvar distress sendromu (RDS) görülme sıklığı açısından term kontrol grupla karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

Tablo 9.4 Fetal-maternal sitokin genotiplerinin dağılımı

	ANNE				BEBEK			
	Genotip	Term	Preterm	p	Genotip	Term	Preterm	p
		n=101	n=100			n=101	n=100	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)			
TNFα-238(G/A)	GG	98(51,0)	94(49,0)	=0,331	GG	88(47,6)	97(52,4)	<0,05
	GA	3(33,3)	6(66,7)		GA	13(81,3)	3(18,8)	
	AA	—	—		AA	—	—	
	Allel				Allel			
	G	199(50,6)	194(49,4)	=0,336	G	189(49,0)	197(51,0)	<0,05
	A	3(33,3)	6(66,7)		A	13(81,3)	3(18,8)	
TNFα-308(G/A)	GG	72(46,2)	84(53,8)	<0,05	GG	67(43,2)	88(56,8)	<0,001
	GA	10(58,8)	7(41,2)		GA	15(75,0)	5(25,0)	
	AA	19(67,9)	9(32,1)		AA	19(73,1)	7(26,9)	
	Allel				Allel			
	G	154(46,8)	17(53,2)	<0,01	G	149(45,2)	181(54,8)	<0,001
	A	48(65,8)	25(34,2)		A	53(73,6)	19(26,4)	
IL-1α4845(G/T)	GG	11(64,7)	6(35,3)	<0,001	GG	10(76,9)	3(23,1)	<0,001
	GT	47(65,3)	25(34,7)		GT	46(74,2)	16(25,8)	
	TT	43(38,4)	69(61,6)		TT	45(35,7)	81(64,3)	
	Allel				Allel			
	G	69(65,1)	37(34,9)	<0,001	G	66(75,0)	22(25,0)	<0,001
	T	133(44,9)	163(55,1)		T	136(43,3)	178(56,7)	
IL-1β-511(C/T)	CC	34(48,6)	36(51,4)	=0,430	CC	35(46,1)	41(53,9)	<0,001
	CT	39(47,0)	44(53,0)		CT	36(40,9)	52(59,1)	
	TT	28(58,3)	20(41,7)		TT	30(81,1)	7(18,9)	
	Allel				Allel			
	C	107(48,0)	116(52,0)	=0,318	C	106(44,2)	134(55,8)	<0,01
	T	95(53,1)	84(46,9)		T	96(59,3)	66(40,7)	

Fetal-maternal sitokin genotiplerinin dağılımı tablo 9.4'te verilmiştir. Maternal ve fetal TNF- α -238 G/A, maternal ve fetal IL-1 α 4845 G/T ve maternal IL-1 β -511 polimorfizmleri Hardy-Weinberg dengesindeydi. Maternal term ve preterm gruplar karşılaştırıldığında, TNF- α -308 G/A ve IL-1 α 4845 G/T polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanırken, TNF- α -238G/A ve IL-1 β -511 G/T polimorfizmleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı.

Fetal term ve preterm gruplar karşılaştırıldığında, TNF- α -238 G/A, TNF- α -308 G/A, IL-1 α 4845 G/T ve IL-1 β -511 G/T polimorfizmleri açısından anlamlı farklılık saptandı.

Tablo 9.5. Fetal TNF- α 238G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	88(47,6)	97(52,4)	<0,05	4,777	0,017	1,317-17,319
GA	13(81,3)	3(18,8)		0,231	0,022	-
AA	-	-		-	-	-

TNF α -238 G/A için hesaplanan OR değerleri tablo 9,5'te görülmektedir. GG genotipini taşıyanların preterm doğum riski GA genotipini taşıyanlara göre 4,77 kat daha yüksektir.

Tablo 9.6. Maternal TNF- α 308G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	72(46,2)	84(53,8)	<0,001	2,463	=0,038	1,049-5,781
GA	10(58,8)	7(41,2)		1,478	=0,540	0,423-5,157
AA	19(67,9)	9(32,1)		-	-	-

Tablo 9.7. Fetal TNF- α 308 G/A için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	67(43,2)	88(56,8)	<0,001	3,565	=0,007	1,416-8,973
GA	15(75,0)	5(25,0)		0,905	=0,883	0,239-3,429
AA	19(73,1)	7(26,9)		-	-	-

Genotipler ile çalışma popülasyonu arasındaki ilişkinin anlamlı bulunduğu maternal ve fetal TNF- α 308 G/A için hesaplanan OR değerleri tablo 9.5 ve 9.6'da görülmektedir. GG genotipini taşıyanların preterm doğum riski AA genotipini taşıyanlara göre daha yüksektir.

Tablo 9.8. Maternal IL-1 α 4845 G/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	11(64,7)	6(35,3)	<0,001	0,340	=0,047	0,117-0,986
GT	47(65,3)	25(34,7)		0,331	<0,001	0,179-0,614
TT	43(38,4)	69(61,6)		-	-	-

Tablo 9.9. Fetal IL-1 α 4845 G/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	10(76,9)	3(23,1)	<0,001	0,167	=0,009	0,044-0,637
GT	46(74,2)	16(25,8)		0,193	<0,001	0,098-0,380
TT	45(35,7)	81(64,3)		-	-	-

Genotipler ile çalışma popülasyonu arasındaki ilişkinin anlamlı bulunduğu maternal ve fetal IL-1 α 4845 G/T için hesaplanan OR değerleri tablo 9.8 ve 9.9'de görülmektedir. Preterm doğum riski TT genotipi taşıyanlara göre daha düşüktür.

Tablo 9.10. Fetal IL-1 β -511 C/T için binary logistik regresyon analizi sonuçları

Genotip	Term n=101, n (%)	Preterm n=100, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
CC	35(46,1)	41(53,9)	<0,001	5,020	<0,001	1,965-12,829
CT	36(40,9)	52(59,1)		6,190	<0,001	2,452-15,627
TT	30(81,1)	7(18,9)		-	-	-

Genotipler ile çalışma popülasyonu arasındaki ilişkinin anlamlı bulunduğu fetal IL-1 β -511 C/T için hesaplanan OR değerleri tablo 9.10'da görülmektedir.

Tablo 9.11. Fetal-maternal TNF α -238G/A polimorfizminin term grupta dağılımı

		Bebek n=101, n (%)			
		TNF α 238			p
Anne n=101 n (%)	TNF α 238	GG	GA	AA	
				87(88,8)	5(5,1)
		1(33,3)	2(66,7)	0(0,0)	
		-	-	-	

Tablo 9.12.Fetal-maternal TNF α -238G/A polimorfizminin preterm grupta dağılımı

		Bebek n=100, n (%)					p
		TNF α -238					
		GG	GA	AA	TOPLAM		
Anne n=100 n (%)	TNF α -238	GG	92(97,9)	2(2,1)	-	94	<0,05
		GA	5(83,3)	1(16,7)	-	6	
		AA	-	-	-	-	

Maternal ve fetal TNF- α -238 G/A polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.11 ve 9.12’de gösterilmiştir. Her iki grupta da ortak GG oranı diğerlerinden yüksek bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Tablo 9.13. Fetal-maternal TNF α -308G/A polimorfizminin term grupta dağılımı

		Bebek n=101, n (%)					p
		TNF α -308					
		GG	GA	AA	TOPLAM		
Anne n=101 n (%)	TNF α -308	GG	51(70,8)	10(13,9)	11(15,3)	72	<0.01
		GA	4(40,0)	5(50,0)	1(10,0)	10	
		AA	12(63,2)	0(0,0)	7(36,8)	19	

Tablo 9.14.Fetal-maternal TNF α -308 G/A polimorfizminin preterm grupta dağılımı

		Bebek n=100, n (%)					p
		TNF α -308					
		GG	GA	AA	TOPLAM		
Anne n=100 n (%)	TNF α -308	GG	79(94,0)	3(3,6)	2(2,4)	84	<0,001
		GA	4(57,1)	1(14,3)	2(28,6)	7	
		AA	5(55,6)	1(11,1)	3(33,3)	9	

Maternal ve fetal TNF- α -308 G/A polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.13 ve 9.14'de gösterilmiştir. Her iki grupta da ortak GG oranı diğerlerinden yüksek bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Tablo 9.15. Fetal-maternal IL-1 α 4845 G/T polimorfizminin term grupta dağılımı

		Bebek n=101, n (%)					p
		IL-1 α					
		GG	GT	TT	TOPLAM		
Anne n=101 n (%)	IL-1 α	GG	4(36,4)	5(45,5)	2(18,2)	11	<0,001
		GT	4(8,5)	28(59,6)	15(31,9)	47	
		TT	2(4,7)	13(30,2)	28(65,1)	43	

Tablo 9.16. Fetal-maternal IL-1 α 4845 G/T polimorfizminin preterm grupta dağılımı

		Bebek n=100, n (%)					p
		IL-1 α					
Anne n=100 n (%)	IL-1 α	GG	GT	TT	TOPLAM	<0,01	
		GG	0(0,0)	3(50,0)	3(50,0)		6
		GT	1(4,0)	8(32,0)	16(64,0)		25
		TT	2(2,9)	5(7,2)	62(89,9)	69	

Maternal ve fetal IL-1 α 4845 G/T polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.15 ve 9.16'de gösterilmiştir. Term grubunda GG ve GT oranı diğerlerinden yüksektir, preterm grubunda TT oranı diğerlerinden yüksektir ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

Tablo 9.17. Fetal-maternal IL-1 β -511C/T polimorfizminin term grupta dağılımı

		Bebek n=101, n (%)					p
		IL-1 β					
Anne n=101 n (%)	IL-1 β	CC	CT	TT	TOPLAM	<0,001	
		CC	18(52,9)	12(35,3)	4(11,8)		34
		CT	10(25,6)	18(46,2)	11(28,2)		39
		TT	7(25,0)	6(21,4)	15(53,6)	28	

Tablo 9.18. Fetal-maternal IL-1 β -511 C/T polimorfizminin preterm grupta dağılımı

		Bebek n=100, n (%)					
		IL-1 β					
		CC	CT	TT	TOPLAM	p	
Anne n=100 n (%)	IL-1 β	CC	19(52,8)	17(47,2)	0(0,0)	36	=0,125
		CT	16(36,4)	24(54,5)	4(9,1)	44	
		TT	6(30,0)	11(55,0)	3(15,0)	20	

Maternal ve fetal IL-1 β -511C/T polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.17 ve 9.18'de gösterilmiştir. Term grubunda anlamlı bir farklılık bulunmazken preterm grubunda CC ve CT oranı diğerlerinden daha yüksektir ve istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 9.19. Fetal haplotip analizi

TNF- α -238 G/A	TNF- α -308 G/A	IL-1 α 4845 G/T	IL-1 β -511 C/T	Grup	n (%)	p
GG	GG	TT	CC	Term	9(8,9)	<0.001
				Preterm	31(31)	
GG	GG	TT	CT	Term	9(8,9)	<0,001
				Preterm	35(35)	

Fetal sitokin genotiplerinin haplotip analizleri tablo 9.19'da gösterilmiştir. Sırasıyla TNF- α -238 GG, TNF- α -308 GG, IL-1 α 4845 TT, IL-1 β -511 CC

genotiplerine sahip olan preterm doğan bebeklerin oranı term doğan bebeklerin oranından daha yüksektir($p<0,001$).

Sırasıyla TNF- α -238 GG, TNF- α -308 GG, IL-1 α 4845 TT, IL-1 β -511 CT genotiplerine sahip olan preterm doğan bebeklerin oranı term doğan bebeklerin oranından daha yüksektir($p<0,001$).

Maternal sitokin genotiplerinin haplotip analizleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak p değerinin %5'e yakın çıkması dikkat çekicidir.

10. TARTIŞMA

Yenidoğan dönemindeki bakım olanaklarının iyileşmesi ile düşük doğum ağırlıklı bebeklerin prognozunda önemli gelişmeler olmasına rağmen, preterm doğum, perinatal mortalite ve morbiditeyi etkileyen önemli bir faktördür. Preterm doğumlarla birçok sosyal, çevresel, medikal ve kalıtsal faktörlerin yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Söz konusu bu çoklu faktörler nedeni ile patogeneizde rol oynayan mekanizmalar ise halen aydınlatılamamıştır (83). Organların immatüritesinden kaynaklanan yenidoğan sorunlarına ek olarak uzun vadede mental retardasyon, serebral palsi, akciğer ve gastrointestinal sistem problemleri, görme ve işitme kaybı gibi eşlik eden sekellerin önlenmesi toplumun genel sağlığı açısından da önemlidir. Bu yüzden erken doğum eyleminden korunma, erken teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi günümüz maternal-fetal tıbbının hedeflerindedir.

İmmünolojik perspektif ile doğum, term evrede fetusun rejeksiyonu olarak tanımlanabilir. Dokunun çeşitli uyarılara verdiği yanıt olarak tanımlanan inflamasyon ise, söz konusu rejeksiyonu tetikleyerek gestasyonel yaşın düşmesine neden olmaktadır. Gelen uyarının imha edilmesi ile sağlıklı dokunun çatısı ve işlevi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin koordineli çalışması ile korunmaktadır. Bu durum gebelikte; gestasyonun erken döneminde aktif olan antiinflamatuvar sitokinlerin, gestasyonel yaşın ilerlemesi ile yerlerini proinflamatuvar sitokinlere bırakması ile kendini göstermektedir. Anti-inflamatuvar sitokinlerin erken evrede çekilip yerini proinflamatuvar sitokinlere bırakması ise spontan düşük ve preterm doğumları tetiklemektedir (33). Bu bigiyi destekleyen diğer bir veri ise; karaciğerden proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak sentezlenen ve akut faz reaktanı olan C reaktif proteininin (CRP) preterm doğumlarda artmasıdır (69). Fetoplasental ünitenin gelişiminde önemli rol oynayan maternal immün sistem ile ilgili yapılan çalışmalar anti-inflamatuvar sitokinlerin trofoblast hücreleri tarafından maternal-fetal yüzeyde sentezlenerek

bu bölgede proinflamatuvar sitokin sentezini baskıladığını göstermiştir. Gebelikte inflamasyona bağlı olarak proinflamatuvar sitokin artışı amnion sıvısı, myometriyum, desidua, fetal membranlar ve maternal serumda gerçekleşmektedir. Gebeliğin üçüncü trimesterinde de enfeksiyondan bağımsız olarak amnion, koryo – desidua ve myometriyumda IL-1 β and IL-8 artışının olması, doğumda enfeksiyondan bağımsız olarak proinflamatuvar sitokinlerin önemine dikkat çekmektedir (27, 37).

IL-1, IL-6, IL-8, IL-5, interferon (IFN) ve TNF proinflamatuvar sitokin ailesinin üyeleridir. Bu ailenin üyelerinden TNF- α ve IL-1, endotelden proinflamatuvar öncüller salınarak vazodilatör veya vazokonstriktör etki yaratılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle proinflamatuvar sitokin ailesi içinden TNF- α ve IL-1 çalışmamızda seçilen sitokinler olmuştur (56).

Sitokin kodlayan genler polimorfik yapıya sahiptir (29, 86). Bu nedenle bireyler arasında ekspresyon farklılıkları görülmektedir. Polimorfik özellikler, proteinlerin ekspresyonlarındaki değişikliklere, hedef moleküllere bağlanmalarına ve aktivitelerinde değişimlere neden olmaktadır. Polimorfizmlerden kaynaklanan protein fonksiyonundaki değişiklikler, hastalıklara yatkınlığı ve hastalığın gelişimindeki klinik tabloyu açıklayabilmektedir (29). Prostaglandin sentezinde rol oynayan serum sitokin düzeylerinin, tekrarlayan gebelik kayıplarında ve preterm doğumlarda artışının nedenlerinden birisi de sitokin genlerindeki polimorfizmlerdir (82). Preterm doğumlar ile sitokin genotip ilişkisini araştıran çalışmaların büyük bir bölümü yalnızca maternal veya fetal genotip ile preterm doğum arası ilişkiyi araştırmıştır. Anne ve fötusun arasındaki ilişki, bir yandan fötal antijen sunulmasını ve diğer yandan da maternal immün sistem tarafından bu antijenlerin tanınması ile belirlenen iki yönlü bir etkileşim olması nedeni ile çalışmamızda maternal-fetal TNF- α (-238 G/A, -308 G/A), IL-1 α (4845 G/T) ve IL-1 β (-511 C/T) genotiplerinin preterm doğumlarla ilişkisi araştırılmıştır.

TNF süperaillesi 18 ligand ve 29 reseptörden oluşur. Etkisini TNFR1 ve TNFR2 aracılığı ile gösterir. TNF, immün reseptör, proteaz, büyüme faktörü ve hücre döngüsünde işlevsel olan genlerin ekspresyonunu kontrol ederek inflamasyon, apoptoz, hücre göçü, proliferasyon ve farklılaşma gibi hücreysel olaylarda görev alır (42).

TNF- α ekspresyonu ilk kez amnion ve plasenta üzerindeki hücrelerden sonra değişik gestasyonel dokularda da eksprese olduğu gösterilmiştir. Söz konusu sitokin villöz trofoblastların apoptozunda ve maternal desidua trofoblastın invazyonunda işlevsel olup, ekspresyon düzeyindeki değişimlerin amniyotik enfeksiyon, reküran düşükler, preeklampsi, preterm doğum ve endometriozis gibi reproduktif sistem hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (42). TNF- α ekspresyonu transkripsiyonel evrede kontrol edilmektedir. Çalışmamızda, TNF- α geninde tanımlanmış -308 G/A ve -238 G/A polimorfizmleri incelenmiştir. Bu polimorfizmler Kakuzyanlarda en sık görünen TNF- α polimorfizmleri olarak bildirilmiştir (47). TNF- α -308 A alleleline sahip bireyler yüksek düzeyde TNF- α sentezlemektedirler. Ek olarak kromozomal lokalizasyonu nedeniyle -308 A alleli HLA A1, B8, DR3, DR4 (yüksek düzeyde TNF- α üretimi) genotipleri ile "linkaj disequlibriumdadır". Artan TNF- α üretimi nedeni ile söz konusu varyasyonun otoimmün hastalıklara ve rejeksiyona neden olabileceği rapor edilmiştir (90). TNF- α promotörünün -254 ile -230 arası represör protein bağlanma bölgesidir. -238 A substitisyonun transkripsiyonel represyona neden olabileceği bildirilmiştir (47). Her iki polimorfizm için inflamasyon ve immün sistem hastalıklarına yatkınlık ve/veya hastalık şiddeti ile ilişkilendirilen araştırmalar vardır (51).

-238 G alleleline sahip olan bireyler yüksek düzeyde TNF- α sentezlemektedirler. Fetoplasental ünite de fötusun yüksek düzeyde TNF- α sentezlemesi ile anti-inflamatuar/proinflamatuar dengesinin bozulmasına bağlı olarak erken doğum tetiklenebilmektedir. Kazzi ve ark. TNF -238 G allelinin

brokopulmoner displazi fenotipi için önemli bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir (51). TNF- α -238 G/A genotiplememizde çalışma popülasyonumuzda homozigot A alleli saptanmamıştır. Benzer durum Ateş ve ark. yaptığı bir çalışmada daha gözlenmiştir. Bunun sebebi toplumumuzda A allelinin daha nadir görülmesidir (6). Bulgularımızda term doğan bebeklerde -238 GA genotipi preterm doğan bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ek olarak maternal - fetal TNF- α -238 GA genotipi term olasılığını da arttırmaktadır ($p<0.05$) (tablo 9.11, 9.12). Koruyucu etki A allelinden kaynaklanmakta olup; term grupta A allelinin oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p<0.05$). Çalışma popülasyonumuzun sayısının artırılması ile daha anlamlı sonuç elde edilebileceği düşünülmektedir.

Preterm doğumlardaki TNF- α -308 G/A polimorfizmi ile ilgili çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Afrikalı Amerikalı annelerde -308 A alleli preterm yatkınlık faktörü olarak tanımlanırken, Beyaz Avrupalılarda bu sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeni A allelinin Afrika kökenli bireylerde frekansının 0.17 olmasından kaynaklanmaktadır. Beyaz Avrupalılarda ise söz konusu frekans %18-27 arasında değişmektedir (1). Dizon Townson ve ark. amniyon sıvısında yüksek düzeyde TNF- α saptanan anne ve bebeklerde A alleli ile TNF- α düzeyi arasında bir ilişki elde edememiştir (23). Amory ve ark. ise -308 G/A polimorfizmi ile preterm arasında bir ilişki saptayamamış ve TNF- α -863 AA genotipinin bir yatkınlık faktörü olduğunu bildirmiştir (3). TNF - α 308 GG genotipi ile ilişki preterm doğum yapan annelerde Moura ve ark. tarafından da bildirilmiştir (62) . Çalışmamızda da TNF- α -308 GA ve AA genotipi term doğum yapan anne ve bebeklerde preterm grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$). Çelişkili sonuçların varlığı ve etnik köken farklılıkları göz önüne alındığında, çevresel faktörlerin modifikasyonunun fenotipe etkisi dikkat çekici niteliktedir. Benzer bir bulgu ise Macones ve ark. yaptığı bir çalışmadan gelmektedir. Bu çalışmanın sonucunda -308 A allelinin tek başına preterm doğum etkeni olmadığı, çevresel faktörlerin (Ör. Bakteriyel vajinozisin) modifikasyonu olduğu rapor edilmiştir (57).

Maternal-fetal genotip kombinasyonunun preterm doğum ile ilişkisi incelendiğinde ise; maternal- fetal TNF- α -308 GA heterozigotluğunun term doğum olasılığını artırırken; heterozigot annenin bebeğinin GG genotipine sahip olması preterm doğum olasılığını arttırmaktadır ($p < 0.01$) (Tablo 9.13 ve 9.14). Maternal- fetal genotip uyumu (yüksek düzey sitokin üreten/yüksek düzey sitokin üreten veya tersi) gestasyonun başarılı olması için bir avantajdır. Fakat genotiplerden biri yüksek düzey sitokin üretirken, diğeri düşük düzeyde sitokin eksprese ediyorsa; bunun aynı transplant rejeksiyonlarında olduğu gibi fetal allograftın reddedilmesine bağlı preterm doğum nedeni olabileceğini düşünmekteyiz (43).

Bakteriyal endotoksinlere karşı desiduanın IL-1 sentezlediği ilk kez Romero ve ark. tarafından rapor edilmiştir (74). IL-1'in intrauterin dokuları uyarak prostaglandin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin sentezini başlatabilmesi nedeni ile intaruterin enfeksiyonlarda doğumu tetikleyen ana faktör olabileceğini düşünülmektedir. Romero ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada ise term ve preterm doğum yapan annelerin amniyon sıvılarında IL-1 düzeyini ölçülmüştür. Çalışma; ikinci trimesterde olmayan IL-1 aktivitesinin üçüncü trimesterde 14 kDa ağırlığında ve izoelektrik noktası 4.9 olan IL-1 α tarafından gerçekleştirildiğini ve bunun da IL-1'in gestasyonel yaşın matürasyonu ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Bu bulguya ek olarak termde spontan doğum yapan kadınlarda amniyon sıvısında IL-1 aktivitesi tespit edilmişken, term olmadan yapılan doğumlarda IL-1 aktivitesi ölçülememesi, IL-1'in term doğumdaki önemine işaret etmektedir. Intraamniyotik enfeksiyonların neden olduğu preterm doğumda amniyon sıvısında IL-1 aktivitesindeki artışın prostoglandin sentezindeki artış ile korelasyon göstermesi IL-1'in intaramniyotik enfeksiyonlara bağlı preterm doğumda rol oynadığının ilk bulgularındandır (73). Daha sonra yapılan çalışmalar da IL-1'in maternal endometriyum ile embriyo arasındaki iletişimi koordine eden, villöz trofoblast, maternal trofoblast ve implantasyonun erken evresinde maternal deciduada ekspresyonu gerçekleşen bir parakrin faktör olduğu rapor edilmiştir (30, 44, 78).

IL-1'in iki formu farklı genler tarafından kodlanmakta ve doğal olarak farklı aminoasit dizilerine sahiptir. Üç boyutlu yapıları birbirine benzemesi nedeni ile benzer reseptörlerle bağlanarak benzer aktiviteyi yerine getirmektedirler (30). IL-1 α ve IL-1 β genindeki polimorfizmlere bağlı olarak söz konusu sitokin düzeyinde oluşan değişikliklerin, periodontal ve kardiovasküler hastalıklara yatkınlık sağlayabileceği bildirilmiştir (31,32). Preterm doğum ile IL-1 arasındaki ilk ilişkilendirme çalışması Afrika- Amerika popülasyonunda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (33). Diğer çalışmalarda ise maternal IL-1 α ve β genotipleri ile preterm doğum arası ilişkisi tanımlanamamıştır (5, 25, 28, 34, 54, 55, 60).

IL-1 α geninde -889 G/T ve 4845 G/T tanımlanmış iki polimorfizmdir. Çalışmamızda yer alan diğer polimorfizmlerin aksine IL-1 α 4845 G/T polimorfizmi genin kodlama bölgesinde lokalizedir.

Çalışma grubumuzda ise IL-1 α 4845 GG ve GT genotipleri term anne ve bebekte anlamlı derecede sık görülürken (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$), preterm doğum yapan anneler ve bebeklerinde IL-1 α 4845 TT genotipi term gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$.) Term doğum yapan annelerde G allelinin preterm doğum yapan annelere göre daha yüksek oranda bulunduğu, preterm annelerde ise T allelinin term annelere göre daha yüksek oranda olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). Bebeklerde de benzer durum kayıt edilmiştir. T allel sıklığı preterm bebeklerde daha yüksektir ($p < 0.001$). IL1- α 4845 GT polimorfizminin maternal-fetal genotip ilişkisinin term ve preterm doğum ile ilişkisinde ise; maternal 4845 GG ve GT genotiplerinin term doğuma yatkınlığı arttırdığı gözlenirken, fetal 4845 TT genotipinin varlığının, anne genotipinden bağımsız olarak preterm doğum olasılığını arttırdığı görülmüştür ($p < 0.01$) (Tablo 9.15, 9.16) . Sentez sonrasında pro-IL-1 α 112-113. aminoasitler arasında bulunan kesim bölgesinden kalpain benzeri proteazlar tarafından kesilerek matür hale getirilir. IL-1 α 4845 T alleli 114.

pozisyondaki alaninin serine değişmesine neden olmaktadır (23). IL-1 α 4845 T allelinin beyaz ırkta preterm doğum için bir risk faktörü olduğunu belirten Engel ve ark. bu durumu matür IL-1 α düzeyinin azalma sına bağlamaktadır (28). Olası diğer bir mekanizma ise oluşan hidrofobik indeksin değişimine bağlı olarak proteazın enzimatik etkisi azalmakta ve proIL-1 α 'nın matür IL-1 α 'ya dönüşümü zorlaştırarak fibrotik kaskadı başlatmaktadır. IL-1 α 'nın literatürde tanımlanmış bu fibrogenik etkisine bağlı olarak interselüler matriksde fibröz doku oluşumunu tetikler. Oluşan fibröz doku inflamasyona ek olarak diğer sitokin (IL-6) ve kemokin sentezini arttırarak gestasyonel yaşın kısalmasında rol oynayabilir. İleri çalışmalar ile bu bulgunun değerlendirilmesi gerekmektedir (14, 29).

IL-1 β adezyon molekülleri ve diğer sitokinlerin ekspresyonunu tetikler. - 511 C/T IL-1 β genin promotör bölgesinde bulunan iki polimorfizmden birisidir. - 511 TT genotipi yüksek düzeyde IL-1 β sentezine neden olduğu bildirilmiştir (26, 27). Çalışmamızda ise IL-1 β -511 TT genotipi term bebeklerde preterm doğan bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. -511 CT genotipinde ise; preterm yatkınlık artarken, CC genotipi ile preterm arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Annelerde de IL-1 β -511 C/T polimorfizminin term veya preterm doğum ile ilişkilendirilmemiştir. Maternal -511 TT genotipi ile fetal CT genotipi preterm yatkınlığı arttırırken, maternal -511 CT veya -511 TT genotipi ile fetal -511 TT genotipleri eşleştğinde term doğum olasılığı artmaktadır (p<0.01) (Tablo 9. 17, 9.18). Verilerimizden elde edilen bu çelişkili IL-1 β promoter aktivitesinin -511 ve -31 arasındaki allelik etkileşimlerin önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak IL-1 etkisini reseptörü aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Reseptörün ekspresyon derecesi de hücresel yanıtta önemli bir etkidir (40). Bu nedenle IL-1 sistemindeki total inflamatuvar fenotipin bir arada incelenmesi preterm doğuma yatkınlığın açıklanabilmesi için gereklidir (40).

Örnek genişliğinin yeterli olmaması nedeni ile uygulanacak testin gücünün düşük olması nedeni ile genotipler ile gebelikte karşılaşılan sorunlara ilişkin hipotez kontrolü istatistiksel olarak yapılmamıştır.

Haplotip analizinin gerçekleştirilmesinde oluşturulan tüm genotip kombinasyonlarında tablo 9.19'da verilen iki haplotipin preterm doğan bebeklerde en yüksek oranda olduğu görülmektedir. Ancak her iki kombinasyona ilişkin preterm doğum oranları arasında görülen %4'lük fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum örnek genişliğinin artırılması durumunda değişebileceği düşünülmektedir.

11. SONUÇ

1. Çalışma popülasyonumuzda TNF- α -238 AA genotipi saptanmamıştır. Bulgularımızda termde doğan bebeklerde -238 GA genotipi preterm bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ek olarak maternal-fetal TNF- α -238 GA genotipi term olasılığını arttırmaktadır ($p<0.05$).
2. TNF- α -308 GA ve AA genotipi term doğum yapan anne ve bebeklerde preterm grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$). Maternal–fetal genotip kombinasyonunun preterm doğum ile ilişkisi incelendiğinde ise; maternal-fetal TNF- α -308 GA heterozigotluğunun term doğum olasılığını artırırken; heterozigot annenin bebeğinin GG genotipine sahip olması preterm doğum olasılığını arttırmaktadır ($p<0.01$).
3. T allel sıklığı preterm doğum yapan anne ve bebeklerde daha yüksektir ($p<0.001$). Maternal IL1- α 4845 GG ve GT genotiplerinin term doğuma yatkınlığı arttırdığı gözlenirken, fetal 4845 TT genotipi, anne genotipinden bağımsız olarak preterm doğum olasılığını arttırmaktadır ($p<0.01$).
4. IL-1 β -511 TT genotipi term bebeklerde preterm doğan bebeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. -511 CT genotipinde ise; preterm yatkınlık artarken, CC genotipi ile preterm arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Annelerde de IL-1 β -511 C/T polimorfizminin term veya

preterm doğum ile ilişkilendirilememiştir. Maternal -511 TT genotipi ile fetal -511 CT genotipi preterme yatkınlığı arttırırken, maternal -511 CT veya -511 TT genotipi ile fetal -511 TT genotipleri eşleştiğinde term doğum olasılığı artmaktadır ($p<0.01$).

5. Antiinflamatuvar/proinflamatuvar sitokin arasındaki dengenin bozulması ile ilişkilendirilen preterm doğum multifaktöryal bir hastalıktır. Çalışmamızın devamında diğer sitokinlerin de genotiplemelerinin yapılmasının uygun olduğu düşünölmektedir.
6. Gen ekspresyonunda çevresel faktörlerin de önemli rol oynaması nedeni ile popölasyonlara özgü veri tabanlarının oluşturulması önemlidir. Topluma özgü verilerin elde edilmesi ile risk altındaki grupların belirlenmesine ek olarak patogenezdaki mekanizmanın aydınlatılabilmesi sağlanabilir.

12. KAYNAKLAR

1. ADCOCK, K., HEDBERG, C., LOGGINS, J., KRUGER, TE., BAIER, RJ., (2003). The TNF-alpha -308, MCP-1 -2518 and TGF-beta1 +915 polymorphisms are not associated with the development of chronic lung disease in very low birth weight infants. *Genes Immun.* **4**(6): 420-6
2. ALLEN, RA., LEE, EM., ROBERTS, DH., PARK, BK., PIRMOHAMED, M. (2001). Polymorphisms in the TNF-a and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation.* **31**: 843-851
3. AMORY, JH., ADAMS, KM., LIN, M., HANSEN, JA. (2004). Adverse outcomes after preterm labor are associated with tumor necrosis factor- α polymorphism -863, but not -308, in mother-infant pairs. *American Journal of obstetrics and Gynecology.* **191**(4): 1362-1367.
4. ANANTH, CV, VINTZILEOS, AM. (2006). Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **19**: 773-82
5. ANNELLS, MF., HART, PH., MULLIGHAN, CG., HEATLEY, SL., ROBINSON, JS., BARDY, P., McDONALD, H. (2004). Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-b, FAS, and mannose-binding protein C gene Polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* **191**: 2056-67
6. ATEŞ, O., HATEMİ, G., HAMURTUDAN, V., TOPAL-SARIKAYA, A. (2008). Tumor Necrosis factor-alpha and Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol.* **27**: 1243-1248
7. BARKSBY, HE., LEA, SR., PRESHAW, PM., TAYLOR, JJ. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology.* **149**:217-225

8. BEKSAC, MS., DEMIR, N., KOC, A. (2001). Gelişen O. Erken Doğum. Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji ÇG. (e.d.) in: OBSTETRİK; Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji. Ankara: Medikal Network. p: 1149-1155
9. BERNAL, AL. (2007). Overview. Preterm labour: mechanisms and management. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 7: 1471-2393-7-S1-S2
10. BILGEHAN, H.(1999). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. İzmir: Barış Yayınları. p: 81-92.
11. BOLAMAN, Z., MUFTUOĞLU., E, BILGIC., O, ERTAN., S.(1993) İmmünoloji (Müftüoğlu E, Ed.). İzmir: Saray Medikal Yayıncılık. p: 79-100.
12. BOZDAG, H., ERTEKIN, K., SEZER, H., et al. (2003). Erken membran rüptürü ve erken doğum eylemi olgularında serum ferritin düzeyi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*. 34(3): 13-16.
13. BULLA, R., FISCHETTI, F., BOSSI, F., TEDESCO, F. (2004). Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus*. 13: 625–629.
14. CHIZZILINI, C., RASCHI, E., REZZONICA, R., TESTONI, C., MALLONE, R., GABRIELLI, A., FACCHINI, A., DEL PAPA, N., BORGHI, MO., DAYER, JM., MERONI, PL. (2002). Autoantibodies to Fibroblasts Induce a Proadhesive and Proinflammatory Fibroblast Phenotype in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatis*. 46(6):1602–1613
15. CHRISTIAENS, I., ZARAGOZA, D., GUILBERT, L., ROBERTSON, SA., MITCHELL, BF., OLSON, DM. (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *Journal of Reproductive Immunology*. 79: 50-57
16. CUNNINGHAM, FG., LEVENO, KJ., BLOOM, SL., HAULTH, JC., GILSTRAP III, LC., WENSTROM, KD., (2005). Preterm birth. In: Williams Obstetrics. 22nd Ed. USA: McGraw-Hill Co;. p: 855-80.
17. CZUPRYNSKI, CJ., HAAK-FRENDSCHO, M. (1997). Cytokines in bacterial and fungal infections. D.G. Remich, J.S. Friedland (Ed.) Cytokines in Health and Disease. New York: Marcel Dekker. p: 591-608

18. DELALEU, N., BICKEL, M. (2000). Interleukin-1 β and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontology* **2004**(35): 42-52 .
19. DINARELLO, CA. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. *Blood*. **77**(8): 1627-52
20. DINARELLO, CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. **15**: 2095-2147.
21. DINARELLO, CA. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *International Reviews of Immunology*. **16**: 457-499.
22. DINARELLO, CA. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*. **27**: 519-50
23. DIZON-TOWNSON, DS., MAJOR, H., VARNER, M., WARD, K. (1997). A promoter mutation that increases transcription of the tumor necrosis factor- α gene is not associated with preterm delivery. *American Journal of obstetrics and Gynecology*. **177**(4): 810-813
24. EBERSOLE, JL., CAPPELLI, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology*. **23**: 19-49.
25. EDWARDS, RK., FERGUSON, RJ., DUFF, P. (2006). The interleukin-1 beta +3953 single nucleotide polymorphism: cervical protein concentration and preterm delivery risk. *Am J. Reprod. Immunol.* **55**(4): 259-64
26. ELAHI, MM., ASOTRA, K., MATATA, BM., MASTANA, SS. (2009). Tumor Necrosis factor alpha -308 gene locus polymorphisms: an analysis of association with health and disease. *Biochimica et Biophysica acta*. **1792**(3):163-72
27. ELIOTT, CL., LOUDON, JA., BROWN, N., SLATER, DM., BENNETT, PR., SULLIVAN, MH. (2001). IL-1beta and IL-8 in human fetal membranes: changes with gestational age, labor, and culture conditions, *Am. J. Reprod. Immunol.* **46**: 260–267

- 28.ENGEL, SAM., ERICHSEN, HC., SAVITZ, AD., THORP, J., CHANOCK, SJ., OLSHAN, AF. (2005). Risk of Spontaneous Preterm Birth is Associated With Common Proinflammatory Cytokine Polymorphisms. *Epidemiology*. **16**(4): 469-477
- 29.ERBEK, SS., YURTCU, E., ERBEK, S., ATAC, FB., SAHIN, FI., CAKMAK, O. (2007). Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Archives of Otolaryngology- Head and Neck Surgery*. **133**(7): 705-9
- 30.FAZLEABAS, AT., KIM, JJ., STRAKOVA, Z. (2004). Implantation: Embryonic Signals and the Modulation of the Uterine Environment. *Placenta*. **25**(1): 26-31
- 31.FEDRICK, J., ANDERSON, ABM. (1976). Factors associated with spontaneous preterm birth. *Br J Obstet Gynecol*. **83**: 342-50
- 32.GARFIELD, RE., ALI, M., YALLAMPALLI, C., IZUMI, H. (1995). Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility. *Semin in Perinatol*. **19**: 41-45
- 33.GENC, MR., FORD, CE. (2010). The clinical use of inflammatory markers during pregnancy *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **22**(2): 116–121
- 34.GENC, MR., GERBER, S., NESIN, M., WITHKIN, SS. (2002). Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J. Obstet Gynecol*. **187**(1): 157-63
- 35.GIBB, W. (1998). The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med*. **30**(3): 235-41
- 36.GOEPFERT, AR., GOLDENBERG, RL., ANDREWS, WW., et al.(2001). The preterm prediction study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*. **184**(3): 483-488
- 37.GOLDENBERG, RL., HAUTH, JC., ANDREWS, WW. (2000). Intrauterine infection and preterm delivery. *N. Engl. J. Med*. **342**: 1500–1507

38. GOLDENBERG, RL., IAMS, J., MERCER, B. et al. (2003). What we have learned about the predictors of preterm birth. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* **27**(3): 185-193.
39. GOLDENBERG, RL., CULHANE, JF., IAMS, JD., ROMERO, R. (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* **371**: 75-84
40. GÜNER, İ., ÖZMEN, D., BAYINDIR, O., (1997). Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri.* **17**: 65-74
41. GULMEZOGLU, E., ERGUVEN, S. (1994). İmmünoloji. Ankara. Hacettepe Taş Kitapçılık; p: 143-150.
42. HAIDER, S., KNOFLER, M. (2009). Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta.* **30**: 111-123
43. HAJEER, AH., HUTCHINSON, IV. (2000). TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microscopy research and technique.* **50**(3): 216-28
44. HANNAN, NJ., PAIVA, P., DIMITRIADIS, E., SALAMONSEN, LA. (2010). Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines?. *Biol Reprod.* **82**(2): 235-245
45. HARAM, K., MORTENSEN, JH., WOLLEN, AL. (2003). Preterm delivery: an overview. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavia.* **82**(8): 687-704.
46. HURME, M., SANTTILA, S. (1998). IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2598–2602
47. KALUZA, W., REUSS, E., GROSSMANN, S., HUG, R., SCHOPF, RE., GALLE, PR., MAERKER-HERMANN, E., HOEHLER, T. (2000). Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238 A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* **114**(6): 1180-3.

48. KARJALAINEN, J., JOKI-ERKKILA, VP., HULKKONEN, J. et al. (2003). The *IL1A* genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults. *Allergy*. **58**(5): 393-396
49. KAWAGUCHI, Y., TOCHIMITO, A., ICHIKAWA, N., HARIGAI, M., KOTAKE, S., KITAMURA, Y., KAMATANI, N. (2003). Association of *IL1A* gene polymorphisms with susceptibility to and severity of systemic sclerosis in the Japanese population. *Arthritis Rheum*. **48**(1): 186-92
50. KAZZI, SNJ., JACQUES, SM., QURESHI, F., QUASNEY, MW., KIM, UO., BUHIMSCHI, IA. (2004). Tumor Necrosis Factor- α Allele Lymphotoxin- α +250 Is Associated with the Presence and Severity of Placental Inflammation among Preterm Births. *Pediatric Research* **56**(1): 94-98
51. KAZZI, SNJ., TROMP, G., QUASNEY, MW., BUHIMSCHI, IA. (2008). Haplotypes of tumor necrosis factor gene and tracheal aspirate fluid levels of tumor necrosis factor-alpha in preterm infants. *Pediatric Research*. **64**(2): 165-70
52. KEELAN, JA., MARVIN, KW., SATO, TA., COLEMAN, M., McCOWAN, LM., MITCHELL, MD. (1999). Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol*. **181**(6): 1530-6
53. KOCH, C.A., PLATT, J.L. (2003). Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. *Springer Semin Immunopathol*. **25**: 95-117
54. KORNMAN, KS., CRANE, A., WANG, HY., Di GIOVINE, FS., NEWMAN, MG., PIRK, FW., WILSON TG Jr. HIGGINBOTTOM, FL., DUFF, GW. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. **24**(1): 72-7
55. KORNMAN, KS., DUFF, GW. (2001). Candidate genes as potential links between periodontal and cardiovascular diseases. *Annals of Periodontology*. **6**(1): 48-57

- 56.KULTURSAY, N. (2003). Fetal ve neonatal proenflamatuar sitokin yanıtı – perinatal beyin ve akciğer zedelenmesi ile ilişkisi. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*. **46**: 299-307
- 57.MACONES, GA., PARRY, S., ELKOUSY, M., CLOTHIER, B., URAL, SH., STRAUSS III, JF. (2004). A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: Preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **190**: 1504-8
- 58.MEIS, PJ. (2005). 17 Hydroxyprogesterone for the prevention of preterm delivery. Lippincott Williams&Wilkins p:1128-34
- 59.MONTAZERI, S., NALLIAH, S., RADHAKRISHNAN, AK. (2010). Association between polymorphisms in human tumor necrosis factor-alpha (308) and -beta (252) genes and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes research and Clinical Practice*. **88**: 139-145
- 60.MOORE, S., IDE, M., RANDHAWA, M., WALKER, JJ., REID, JG., SIMPSON, NAB. (2004). An investigation into the association among preterm birth, cytokine gene polymorphisms and periodontal disease *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. **111**: 125–132
- 61.MOORE, TR. (1995). Patterns of human uterine contractions: Implications for clinical Practise. *Semin in Perinatol* **19**: 64-72
- 62.MOURA, E., MATTAR, R., de SOUZA, E., TORLONİ, MR., GONÇALVES-PRIMO, A., DAHER, S. (2009). Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *Journal of Reproductive Immunology*. **80**: 115-121
- 63.OLSON, DM., MIJOVIC, JE., SADOWSKY, DW. (1995). Control of human parturition. *Semin in Perinatol*. **19**: 52-53
- 64.OPAL, SM., DePALO, VA. (2000). Anti-inflammatory Cytokines. *Chest*, **117**: 1162-1172

65. OPPENHEIM, JJ., RUSCETTI, FW. (2001). Cytokines. In: Parslaw TG, Stites OP, Terr AI, Imoden JB(Eds.). Lange Medical Immunology. 10th Ed., New York: Lange Medical Books/ McGraw Hill. p: 148-167
66. PARSONS, MT., SPELLACY, WN. (1997). Erken Doğum Eylemi. In: Danforth Obstetrik ve Jinekoloji. Scott JR, Disaia PJ, Hammond CB, Spellacy WN. JB Lippincott Company 7. Baskı. Yüce reklam/yayım/dağıtım. İstanbul. p:289-304.
67. PATERNOSTER, DM., STELLA, A., GERACE, P. et al. (2002) Biochemical markers for the prediction of spontaneous preterm birth. *Int J Gynaecol Obstet.* **79**(2): 123-129.
68. PLUNKETT, J., MUGLIA, LJ. (2008). Genetic contributions to preterm birth: implications from epidemiological and genetic association studies. *Annals of Medicine.* **40**(3): 167-195.
69. POTKUL, RK., MOAWAD, AH., PONTO, KL. (1985). The association of subclinical infection with preterm labor: the role of C-reactive protein. *Am J Obstet Gynecol.* 153: 642–645
70. ROBERT, L., GOLDENBERG, MD. (2002). The management of preterm labor. *Obstetrics and Gynecology.* **100**(5): 1020-37
71. ROBERTSON, PA., SNIDERMAN, SH., LAROS, RK. (1992). Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **166**(6): 1629-41.
72. ROMERO, R., GOMEZ, R., BAUMANN, P. et al. (1997). The role of infection and cytokines in preterm parturition in Chwalisz K and Garfield RE (eds) Basic Mechanisms Controlling Term and Preterm Birth Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg p:197.
73. ROMERO, R., BRODY, DT., OYARZUN, E., MAZOR, M., WU, YK., HOBBS, JC., DURUM, SK. (1989). Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* **160**: 1117-23

- 74.ROMERO, R., WU, YK., BRODY, DT., OYARZUN, E., DUFF, GW., DURUM, SK. (1989). Human decidua: a source of interleukin-1. *Obstet Gynecol.* **73**(1): 31-4
- 75.SAJI, F., SAMEJIMA, Y., KAMIURA, S., SAWAI, K., SHIMOVA, K., KIMURA, T. (2000). Cytokine production in chorioamnionitis. *Journal of Reproductive Immunology.* **47**(2): 185-96
- 76.SATA, F., TOYA, S., YAMADA, H., SUZUKI, K., SAIJO, Y., YAMAZAKI, A., MINAKAMI, H., KISHI, R. (2009). Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in a Japanese population. *Molecular Human Reproduction.* **15**(2): 121-30.
- 77.Şener, T. (1996). Preterm Eylem ve Doğum. in: Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Önderoğlu LS. Güneş Kitabevi. Ankara. p: 1465-1480.
- 78.SIMON, C., FRANCES, A., PIQUETTE, GN., HEINDRICKSON, M., MILKI, A., POLAN, ML. (1994). Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab.* **78**: 847–854.
- 79.SMITH, AJP., HUMPRIES, SE. (2009) Cytokine and cytokine receptor polymorphisms and their functionality, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* **20**: 43-59
- 80.SMITH, AJP., KEEN, LJ., BILINGHAN, MJ. et al. (2004). Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the *IL1R1-IL1A*, *IL1B-IL1RN* gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun.* **5**(6): 451-460
- 81.SOHL, G., WILLECKE, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research.* **62**: 228-232
- 82.TEPELI, E., ULUDAG, A., SENDEL, T., KUTLAY, O., MUSLUMANOGLU, H. (2009). Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Hastalara İnterlökin-1 β Gen Polimorfizminin İerlendirilmesi. Nobel Medikus

83. THELLIN, O., HEINEN, E. (2003). Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology*. **185**: 179-184
84. TOCCI, MI., SCMIDT, JA. (1997). Interleukin-1: Structure and function. D.G. Remich, J.S. Friedland (Ed.) *Cytokines in Health and Disease* New York: Marcel Dekker. p: 1-28
85. TRACEY, KJ. (1997). Tumor necrosis factor. D.G. Remich, J.S. Friedland (Ed.) *Cytokines in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker p: 223-240
86. UBOLDI de CAPEI, M., DAMETTO, E., FASANO, ME., RENDINE, S., CURTONI, ES. (2003). Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population *European Journal of Immunogenetics* **30**: 5-10
87. VELEZ, DR., FORTUNATO, SJ., MORGAN, N., EDWARDS, TL., LOMBARDI, SJ., WILLIAMS, SM., MENON, R. (2008). Patterns of cytokine profiles differ with pregnancy outcome and ethnicity. *Human Reproduction*. **23**(8): 1902-9
88. WILCZYNSKI, JR. (2005). Th1/Th2 cytokines balance—*yin* and *yang* of reproductive immunology. *JR. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **122**(2): 136-143
89. WILSON, AG, SYMONS, JA, McDOWELL, TL, McDEVITT, HO. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 3195-3199
90. YUCESOY B., VALLATYAN, V., LANDSITTEL, DP., SIMEONOVA, P., MICHAEL, I. (2002). Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. *Molecular and Cellular Biochemistry* **234/235**: 219–224
91. YUCESOY, B., VALLYATHAN, V., LANDSITTEL, DP., SHARP, DS., WESTON, A., BURLESON, GR., SIMEONOVA, P., McKINSTRY, M., LUSTER, MI. (2001). Association of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 Gene polymorphisms with Silicosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **172**,:75–82.