T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI

BEYİN BEYAZ CEVHER HASARI MODELİNDE MATERNAL PENTOKSİFİLLİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

DR. MUSTAFA DİLEK

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ABDULLAH KUMRAL

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından desteklenmiştir.

İZMİR-2011

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
SİMGELER KISALTMALAR	1
TABLOLAR VE GRAFİKLER	2
ÖZET	3
SUMMARY	4
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ NÖROPATOLOJİSİ	7
PREMATÜRE İNSAN BEYNİNDE MAJÖR GELİŞİMSEL OLAYLAR ve PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ GELİŞİMİ	8
PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ PATOGENEZİ ve NÖROBİYOLOJİSİ	10
PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİNİN ÖNLENMESİNE YÖNELİK UYGULAMALAR	15
PENTOKSİFİLLİN	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
4. SONUÇLAR	25
5. TARTIŞMA	33
6. KAYNAKLAR	37

SİMGELER KISALTMALAR

AMPA	**:**	A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BBC	**:**	Beyin Beyaz Cevher
BPD	**:**	Bronkopulmoner Displazi
cAMP	**:**	Siklik Adenozin Mono Fosfat
ÇDDA	**:**	Çok Düşük Doğum Ağırlıklı
DAB	**:**	Diaminobenzidin
DNA	**:**	Deoksiribonükleik Asit
dUTP	**:**	Deoksi Uridin Tri Fosfat
E.coli	**:**	Escherichia Coli
EMR	**:**	Erken Membran Rüptürü
FDA	**:**	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GABA	**:**	Gama Amino Butyric Acid
GE	**:**	Ganglionik Eminens
GluR2	**:**	Metabotropik Glutamat Reseptör -2
GP	**:**	Globus Pallidus
GSH	**:**	Glutatyon
i.p.	**:**	İntrapertioneal
IL-1	**:**	İnterlökin-1
IL-1ß	**:**	İnterlökin-1ß
IL-6	**:**	İnterlökin-6
INF-ɣ	**:**	İnterferon-Gama
IUGR	**:**	İntrauterin Büyüme Kısıtlığı
İVH	**:**	İntraventriküler Hemoraji
LPS	**:**	Lipopolisakkarit
MAS	**:**	Mekonyum Aspirasyonu Sendromu
MBP	**:**	Myelin-Basic-Protein
MRG	**:**	Magnetik Rezonans Görüntüleme
NEK	**:**	Nekrozitan Enterokolit
OL	**:**	Oligodentrosit
Öncül-OL	**:**	Öncül Oligodentrosit(Pre-OL)
P	**:**	Putamen
PBS	**:**	Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PPHN	**:**	Persistan pulmoner hipertansiyon
PTX	**:**	Pentoksifilin
PVL	**:**	Periventriküler Lökomalazi
RM	**:**	Rotary mikrotom
SVZ	**:**	Subventriküler zon
T	**:**	Talamus
TBARS	**:**	Thiobarbituric Acid-Reactive Substance
TNF-α	**:**	Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
USG	**:**	Ultrasonografi
WM	**:**	White Matter
WMI	**:**	White Matter Injury

TABLOLAR VE GRAFİKLER

Şekil 1 : Kistik ve Non-kistik PVL'nin şematik diagramı

Şekil 2 : Koronal kesitte PVL fokal ve diffüz komponentlerinin ve serebral vasküler desteğin şematik gösterilmesi

Şekil 3 : PVL'de Oligodendrosit ölümü patogenezi: İVH, ekstrasellüler glutamat artışı, maternal-fetal infeksiyon veya inflamasyon sonucu gelişen serbest oksijen radikal radikallerinin merkezi rolü

Tablo 1 : Rutin Doku Takibi

Tablo 2 : Gruplar arası MBP immün skoru ve Beyin/vücut ağırlığı verileri

Tablo 3 : Gruplar arası tunel ve kaspaz-3 immün skorları ve apopitotik hücre yüzdesi

Grafik 1 : MBP immün skoru değerleri

Grafik 2 : Gruplar arası beyin/vücut oranları

Grafik 3 : Tunel immün skor değerleri

Grafik 4 : Kaspaz-3 immün skor değerleri

Grafik 5 : Apopitotik hücre yüzdesi

Resim 1 : Periventriküler alan Miyelin Basic Protein immunreaktivitesi

Resim 2 : Periventriküler alan TUNEL reaktivitesi

Resim 3 : Periventriküler alan Aktive Kaspaz-3 immunreaktivitesi

ÖZET

Periventriküler lökomalazi (PVL) prematüre bebeklerde beyin hasarının ve kronik nörolojik morbiditenin en sık nedenidir. Günümüzde PVL'nin önlenmesi ve tedavisine yönelik spesifik bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Patogenezinde iskemi/reperfüzyon, serbest radikal oluşumu, glutamat gibi nörotransmitterlere bağlı eksitotoksite, serebral kan akımı regülasyonunun bozulması, annede veya fetustaki infeksiyon ve inflamatuar mekanizmalar suçlanmaktadır. Pentoksifilin (PTX) temel olarak IL-6, TNF-α, INF-ɣ gibi proinflamatuar sitokin artışını baskılayan bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Erişkin ve çocukluk yaş gruplarında infeksiyöz, inflamatuar ve vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Bu araştırmada gelişmekte olan sıçan beyninde lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulmuş beyin beyaz cevher (BBC) hasarı modelinde PTX'nin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Gebe wistar suşu sıçanlarda gebeliğin 18. ve 19. gününde LPS (500 mikrogram/kg intraperitoneal) uygulaması ile BBC hasarı modeli oluşturulmuştur. Kontrol grubuna aynı hacimde serum fizyolojik enjekte edilmiştir. PTX 60 mg/kg (Trental ampul 300 mg/15cc) gebeliğin 18., 19. ve 20. gününde intraperitoneal yolla uygulanmıştır. LPS, LPS+PTX ve kontrol grubu olarak 3 çalışma grubu oluşturulmuştur. Yavru ratlar 7 günlük olduğunda sakrifiye edilerek myelin-basic-protein, tunel, kaspaz-3 ile immün-histokimyasal olarak boyanmıştır. LPS uygulaması ile apopitozisin arttığı, miyelinizasyonun azaldığı saptanmıştır. PTX tedavisinin ise apopitozisi ve hipomiyelinizasyonu azalttığı gözlenmiştir. PTX tedavisinin LPS ile oluşturulan BBC hasarında nöronal apopitozise ve hipomiyelinizasyona karşı koruyucu etkisinin olduğu immün histokimyasal olarak gösterilmiştir. Ancak bu etkinin hangi yollar ile gerçekleştiğini aydınlatacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

THE EFFECT OF MATERNAL PENTOXIFYLLINE TREATMENT ON MODEL OF BRAIN WHITE MATTER INJURY

Periventricular leukomalacia, specifically characterized as white matter injury, that neonates is strongly associated with the damage of pre-myelinating oligodendrocytes. No specific therapy for PVL is presently available, because the pathogenesis is not well understood. The pathogenesis of PVL is complex and likely involves ischemia/reperfusion, free radical formation, excitotoxicity by glutamate, impaired regulation of cerebral blood flow, a procoagulant state, and inflammatory mechanisms associated with maternal and/or fetal infection. Recent studies have shown that administration of lipopolysaccharide (LPS) to pregnant rats causes white matter injury (WMI). Pentoxyfilline (PTX) is a phosphodiesterase inhibitor, supresses pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interferon-γ, has been used in a range of infectious, vascular, and inflammatory conditions in adults and children. PTX is also an anti-coagulant factor with anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-oxidant, and cytoprotective activities. Using an established animal model of human PVL we investigated whether PTX could reduce endotoxin-induced WMI in the developing rat brain. LPS (500 microg/kg) suspension was administered intraperitoneally to pregnant rats at 18 and 19 days of gestation. PTX (60 mg/kg) was administered intraperitoneally to pregnant rats at 18,19 and 20 days of gestation. The control group was treated with pyrogen-free saline. Rats were divided into three groups: control group, LPS-treated group, LPS+PTX-treated group. Rats were kept alive till 7^{th} days. Using immunohistochemistry techniques, we investigated the effects of maternal administration of LPS on myelin basic protein (MBP) staining, as a marker of myelination in the periventricular area in the neonatal rat brain. MBP staining was significantly less and weaker in the brains of the LPS-treated group as compared with the PTX-treated group. PTX treatment significantly reduced the number of apoptotic cells in the periventricular white matter shown on tunel and caspase-3.

In conclusion, this is the first study indicating that PTX may provide protection against an LPS-induced inflammatory response and WMI in the developing rat brain. In addition, our results support the possible use of PTX treatment in pregnant women with maternal or placental infection to minimize the risk of PVL and cerebral palsy.

GİRİŞ

Periventriküler lökomalazi (PVL) prematüre bebeklerde beyin hasarının ve nörolojik morbiditenin en sık nedenidir. Neonatoloji bilimindeki yenilikler sayesinde çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin % 90'ı yenidoğan döneminde yaşatılmaktadır. Yaşayanların yaklaşık %5-10'unda serebral palsi gibi önemli motor bozukluklar görülmekte, %25-50'sinde ise sonraki yıllarda duyusal, kognitif ve davranışsal fonksiyonlarda önemli bozukluklar gözlenmektedir[1-6].

Prematüre bebeklerdeki vasküler anatomik bütünlüğün ve serebrovasküler otoregülasyonun yetersizliği, oligodendrositlerin maturasyon aşamasında olması PVL oluşumuna zemin hazırlamaktadır[7] .

Beyin beyaz cevher (BBC) hasarının altta yatan nedeni tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, maternal veya plasental infeksiyonların, IL1-α ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerde artışa neden olarak yenidoğanda beyin hasarına yol açtığı bilinmektedir. Bir metilksantin türevi olan pentoksifilin (PTX) hücre içi cAMP düzeyini arttırarak TNF-α gen transkripsiyonunu inhibe etmektedir[8, 9]. PTX, TNF-α'nın indüklediği nötrofil aktivasyonunu inhibe eder[10]. Ayrıca anti-trombotik aktivitesi vardır ve endotel hücresinin prostasiklin sentezini indüklemektedir. Bu iki özelliğin endotoksinin neden olduğu bozulmuş doku perfüzyonunu iyileştirmesi beklenmektedir[11]. Pentoksifilinin bu özellikleri PVL'de de nöroprotektif etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Günümüzde PVL'nin önlenmesi ve tedavisine yönelik spesifik bir tedavi modeli bulunmamaktadır. PVL patofizyolojisi göz önünde bulundurularak anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-apopitotik özelliği olan çeşitli farmakolojik ajanlar tedavide denenmiştir[12]. BBC hasarının oluşmasını engellemeye veya azaltmaya yönelik yaklaşımların intrauterin dönemden itibaren değerlendirilmesi gerekmektedir[13].

Bu nedenle çalışmamızda hayvan BBC hasarı modelinde intrauterin dönemde pentoksifillin kullanımının etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece maternal uygulanan pentoksifillin tedavisinin BBC hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilebilirse prematüre bebeklerin en ciddi sorunlarından biri olan PVL'in önlenmesinde önemli bir adım atılmış olacaktır.

GENEL BİLGİLER

Gelişmekte olan beyindeki iskemik ve inflamatuar etkilenmeler nörolojik hasarla sonuçlanmaktadır. Perinatal beyin hasarının derecesi gestasyonel yaşla oldukça ilişkilidir. Prematüre bebeklerde özellikle serebral beyaz cevherdeki immatür oligodendroglialar ve neokorteksin altındaki subplate nöronlar etkilenmektedir[12].

Neonatoloji alanında görülen pek çok problemin içerisinde prematüre bebeklerde gözlenen beyin hasarı ve bu hasarın önlenmesi oldukça önemli bir yer tutar. Amerika Birleşik Devletlerinde 2009 yılında 4.131.019 doğum gerçekleşmiştir. Bu doğumlardan dünyaya gelen yaklaşık olarak 63.000 bebek 1500 gramın altındadır[7, 14, 15]. Aynı yıl ise Türkiye'de 1.241.617 doğum gerçekleşmiştir ve 35 yenidoğan yoğun bakım merkezine yatan 17443 bebeğin 2560 (% 14.6)'ı 1500 gramın altında ve 5110 (% 29)'u 34 haftanın altında olduğu bildirilmiştir[14, 16]. Neonatoloji bilimindeki yenilikler sayesinde bu bebeklerin % 90'ı yenidoğan döneminde yaşatılmaktadır. Ülkemizde son on yılda yenidoğan ölüm hızı 1000 bebekte 29 dan 8.5'e gerilemiştir[17]. Yaşayanların yaklaşık %5-10'unda serebral palsi gibi önemli motor bozukluklar görülmekte ve %25-50'sinde ise sonraki yıllarda duyusal, kognitif ve davranışsal fonksiyonlarda önemli bozukluklar gözlenmektedir[1-6]. Özellikle, majör motor defisit olmaksızın gözlenen kognitif bozukluklar, günümüzde erken doğan bebeklerde gözlenen en sık nörogelişimsel sekeldir. Doğum ağırlığı < 1000 gram preterm infantların yaşama oranı %70 olup bunların %50'sinden fazlasında çeşitli nörogelişimsel bozukluklar ortaya çıkmaktadır[18, 19].

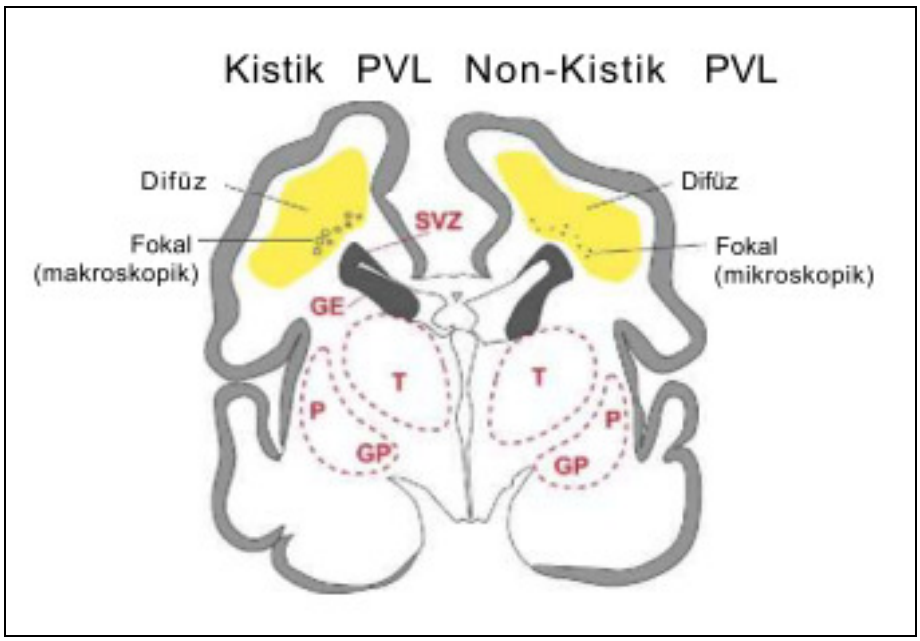
Preterm bebeklerde gözlenen beyin hasarı nöropatolojisi çok sayıda lezyonu kapsamaktadır. Görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) infantlarda %50'ye varan oranlarda görülen PVL'nin en sık görülen nöropatoloji olduğu ortaya konmuştur. PVL'ye nöronal/aksonal anomaliler, intraventriküler kanama, periventriküler hemorajik infarkt ve post-hemorajik hidrosefali eşlik etmektedir[7].

PVL klasik olarak sonrasında kistik lezyonlara dönüşen fokal nekrotik değişiklikleri veya daha az ciddi ancak yaygın olan belirgin astrogliozis ve mikrogliozisle seyreden diffüz beyaz cevher hasarını içermektedir. Diffüz nonfokal lezyonlardan oluşan beyaz cevher hasarı, fokal nekroz ve kist oluşumuyla seyreden klasik forma göre daha sık görülmektedir. Neonatal görüntüleme çalışmalarında, ÇDDA pretermlerde, klasik PVL'nin % 3-5 oranında, diffüz formun %20-50 oranında görüldüğü saptanmıştır[20]. Beyaz cevher hasarının preterm beyin hasarındaki önemi uzun süredir bilinmektedir. Ancak yakın zamanda magnetik rezonans görüntüleme (MRG) çalışmaları, bu bebeklerde serebral nöronal anormalliklerin de oldukça sık olduğunu göstermiştir. Preterm bebeklerin

%50'sinde majör motor fonksiyonlarda etkilenme olmaksızın kognitif fonksiyonlarda bozulma olduğu göz önünde bulundurulduğunda, gri cevher hasarının da olaya katılması şaşırtıcı görünmemektedir. Nöronal /aksonal hasarın da temel olarak PVL'ye eşlik ettiğinin anlaşılması nedeniyle son yıllarda klasik PVL terimi yerine "prematüre ensefalopatisi " terimi de tercih edilmektedir[7, 21].

PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ NÖROPATOLOJİSİ

PVL sıklıkla birlikte olduğu nöronal-aksonal hasarı da içermektedir. "PVL" terimi beyaz cevher hasarını temsil etmektedir. Genellikle derin beyaz cevherdeki hasar, yüzeyel hasara göre daha ağırdır. Beyaz cevher derinliklerinde tüm hücresel elementlerin kaybıyla seyreden fokal nekroz ve öncül oligodendrositlerin (öncül-OL) hasarıyla belirgin astrositoz ve mikrogliozis ile diffüz seyreden iki ana komponeneti vardır (Şekil 1). Fokal nekrotik lezyonlar makroskopik büyüklükte olabilir ve kranial ultrasonografi (USG) veya MRG'de saptanabilen kistler oluşturabilmektedir. Bu kadar ağır lezyonlar modern neonatal yoğun bakım ünitelerinde ÇDDA bebeklerin %5'inden daha azında saptanmaktadır. Daha sık olarak fokal nekrotik lezyonlar mikroskobik büyüklüktedir ve görüntüleme yöntemleriyle kolayca görülemeyen küçük glial skarlar bırakmaktadır.



Şekil 1 Kistik ve Non-kistik Periventriküler Lökomalazi'nin şematik diagramı. Kistik PVL'de fokal nekrotik lezyonlar makroskopiktir ve primer olarak kiste dönüşürler. Non-kistik PVL'de lezyonlar mikroskobiktir ve primer olarak glial skara dönüşürler. Diffüz komponent (sarı renk) öncül-OL hasarı, astrogliozis, mikrogliozis ile karakterizedir. Kısaltmalar: SVZ, subventriküler zon; GE: ganglionik eminens ; T, talamus; P, putamen; GP, globus pallidus[7].

Diffüz PVL komponentindeki öncül-OL hasarı, hücre ölümü veya hücrenin fonksiyonel matür hücrelere farklılaşamamasını içermektedir. Her iki tip hasar sonucunda da matür oligodendrositlerde azalma ve hipomyelinizasyon kaçınılmazdır[7]. Diffüz PVL nöropatolojisi ve nörogörüntüleme arasındaki ilişki tam olarak ortaya konmamıştır. Ancak diffüz PVL komponenti MRG'de diffüz sinyal anormallikleri ve difüzyon parametrelerindeki bozukluklar olarak karşımıza çıkmaktadır[22, 23].

PREMATÜRE İNSAN BEYNİNDE MAJÖR GELİŞİMSEL OLAYLAR ve PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ GELİŞİMİ:

PVL insan beyin gelişiminde son derece hızlı ve karmaşık olayların olduğu dönemde, 24. ve 40. haftalar arasında oluşmaktadır. Bu gelişimsel olayların hızlı ve kompleks olması iskemi, inflamasyon, eksitotoksisite ve serbest radikal hasarı gibi endojen ve eksojen etkilere duyarlılığı artmıştır.

Miyelinleşme öncesi oligodendrositler (Öncül-OL): Öncül-OL'ler, PVL'de anahtar hücresel hedeftir ve büyük bir kısmı insan beyaz cevherinde gebeliğin 24.-40. haftaları arasında bulunmaktadır. Gelişen aksonların etrafında kılıf oluşturduktan sonra myelin oluşturan matür oligodendrositlere farklılaşmaktadır. Bu maturasyon süreci eksitotoksisite ve serbest radikal hasarına yol açan iskemi ve inflamasyona duyarlılığı artırmaktadır[7].

Mikroglialar: İnsan beyninde mikroglialar 16-22. haftalarda belirginleşmeye başlamakta ve en yüksek düzeye 3. trimesterde ulaşmaktadır. Normal beyin gelişiminde, aksonal gelişimde, miyelinizasyonda ve apopitozisde mikroglialar önemli rol oynamaktadır. İskemi veya inflamasyonla aktive olup serbest radikaller oluşturmakta, hasarlayıcı sitokinler salgılamakta ve eksitoksisiteye neden olmaktadır[7].

Aksonlar: Aksonal gelişim subplate gelişimle uyum içindedir. Maksimum hıza 20. gestasyonel haftadan sonra ulaşmaktadır.

Subplate nöronlar: Kortikal tabakanın hemen altında yer almaktadır. Maksimum gelişimleri PVL'e duyarlılığın en yaygın olduğu dönemde 24-32. haftalarda olmaktadır. Prematüre dönemde serebral beyaz cevherdeki iki temel nöron tipi subplate nöronlar ile geç migrasyona uğrayan GABAerjik nöronlardır. Subplate nöronlar subkortikal beyaz cevherde, geç migrasyona uğrayan GABAerjik nöronlar ise santral beyaz cevherde yerleşmiştir. Bu nöronlar serebral kortikal ve talamik gelişimde önemli rol almaktadır.

Subplate gelişimi serebral korteksin, aksonların ve derin nükleer yapıların (özellikle talamus) gelişimi ile yakından ilişkilidir. Subplate nöronlar eksitatör aminoasit reseptörü içerir ve immatür hayvan modellerinde hipoksi-iskemiye duyarlı oldukları

gösterilmiştir. PVL'de serebral korteks ve talamusta oluşan volümetrik kayıp, eşlik eden subplate nöron hasarını düşündürmektedir. Küçük bir otopsi çalışmasında PVL'li preterm bebeklerde subplate bölgesinde apopitozisin arttığı, santral beyaz cevherde ise GABAerjik nöronların azaldığı gösterilmiştir[7].

Subventriküler Zon ve Geç Migrasyon Yapan GABAerjik Nöronlar: 20. gestasyonel haftadan 25-27. haftalara kadar, GABAerjik nöronlar dorsal telensefalik SVZ'un, korteksin karakteristik hücrelerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Deneysel çalışmalarda bu hücrelerin 3. trimesterde de migrasyonunu sürdürdüğü gösterilmiştir. 1) Tüm kortikal nöronların %20-%30'unu oluşturması, 2) İnsan korteksinde uygunsuz olarak en ince tabaka olan üst kortikal tabakalarda yer almaları, 3) Gelişimle birlikte sayıca artışları, 4) Kortikal fonksiyonların koordinasyon ve bütünlüğünde rol oynamaları, böylelikle kognitif fenomende anahtar rol oynamaları bu nöronların önemini arttırmaktadır[7].

Talamus: Talamus gelişimi, özellikle Talamik GABAerjik nöronlar serebral kortikal gelişimle büyük oranda benzerlik göstermektedir. Kortekste olduğu gibi, önemli oranda nöronal gelişim 20. gestasyonel haftadan önce, primer olarak diensefalik ventriküler zondan başlamaktadır. Kortekse benzer şekilde ventral telensefalik ganglionik eminensden geç bir nöron dalgası da dorsal talamusa göç etmektedir. Bu nöronlar büyük oranda GABA'erjiktir. Korteksle uyumlu olarak nöronların yaklaşık %30'u GABAerjiktir[7].

Preterm bebeklerde talamusun tutulumu term yaşa ulaşınca veya daha ileri dönemde yapılan volümetrik MRG çalışmaları ile gösterilmiştir. Nöropatoloijk bir çalışmada PVL'li infantların %60'ında talamusta nöronal kayıp, aksonal dejenerasyon ve gliozis olduğu ortaya konmaktadır[24]. Özellikle mediodorsal nükleus etkilenmektedir. Mediodorsal nükleus, prefrontal korteks ve limbik kortex arasında çapraz bağlantılar kurarak kognitif ve duyusal fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. PVL'de, talamusun mediodorsal nükleusu gliozise uğrayarak nöron kaybetmektedir[7].

Bazal ganglionlar: ÇDDA preterm bebeklerin postkonsepsiyonel 40. haftadan sonraki dönemde değerlendirilen volümetrik MRG çalışmalarında talamusa benzer şekilde bazal ganglionlarda da volüm kaybı sık olarak görülmektedir. Geniş bir nöropatolojik çalışmada, PVL'li infantların % 50-60'ında bazal ganglionlarda gliozis, % 15-30'unda nöronal kayıp gözlenmiş, bu bulgular PVL saptanmayan infantların çoğunda görülmemiştir [25]

Serebral Korteks: Preterm dönem ileri MRG teknikleri ile değerlendirildiğinde serebral kortikal gelişimde; serebral korteks volümünde 28-40. haftalar arasında 4 kat artış ve giral gelişime paralel olarak kortikal yüzey alanında dramatik artış gibi iki çarpıcı özellik ortaya çıkmaktadır. Kortikal nöronlar büyük oranda erken prolifere olan ventriküler/subventriküler zondan migrasyon sonucu oluşmaktadır[7].

PVL'li pretermlerde serebral korteks tutulumu olası gözükse de hala tam açıklığa kavuşmamıştır. Son on yılda, preterm infantlarda en erken term yaşa ulaştığında değerlendirilen MRG çalışmalarında çok sayıda kortikal alanın hasara uğradığı gösterilmiştir. Beyaz cevherin üzerinde bulunan parieto-oksipital korteks en duyarlı bölgedir. Geç çocukluk döneminde değerlendirilen infantlarda parieto-oksipital, sensori-motor, premotor, temporal ve hipokampal kortekslerde kalıcı volümetrik kayıplar gözlenmiştir. Beklenildiği gibi, bu kortikal kayıplar, hastaların uzun dönem izlemlerinde karşılaşılabilecek kognitif bozukluklar ile korelasyon göstermektedir[26-29]. MRG çalışmalarının tersine kortikal defisit, nöropatolojik çalışmalarda açıkça gösterilememiştir. MRG ve nöropatoloji arasındaki uyumsuzluğun nedeni ise nöropatolojik yöntemlerin yeterince gelişmemiş olmasına bağlanmıştır[26-29].

PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİ PATOGENEZİ ve NÖROBİYOLOJİSİ

PVL patofizyolojisi birbiriyle etkileşen 3 ana faktörü içermektedir.

1. Vasküler anatomik ve fizyolojik faktörler
2. Oligodendrosit öncüllerinin maturasyon bağımlı duyarlılıkları

2.1 *Serbest oksijen radikal hasarı*

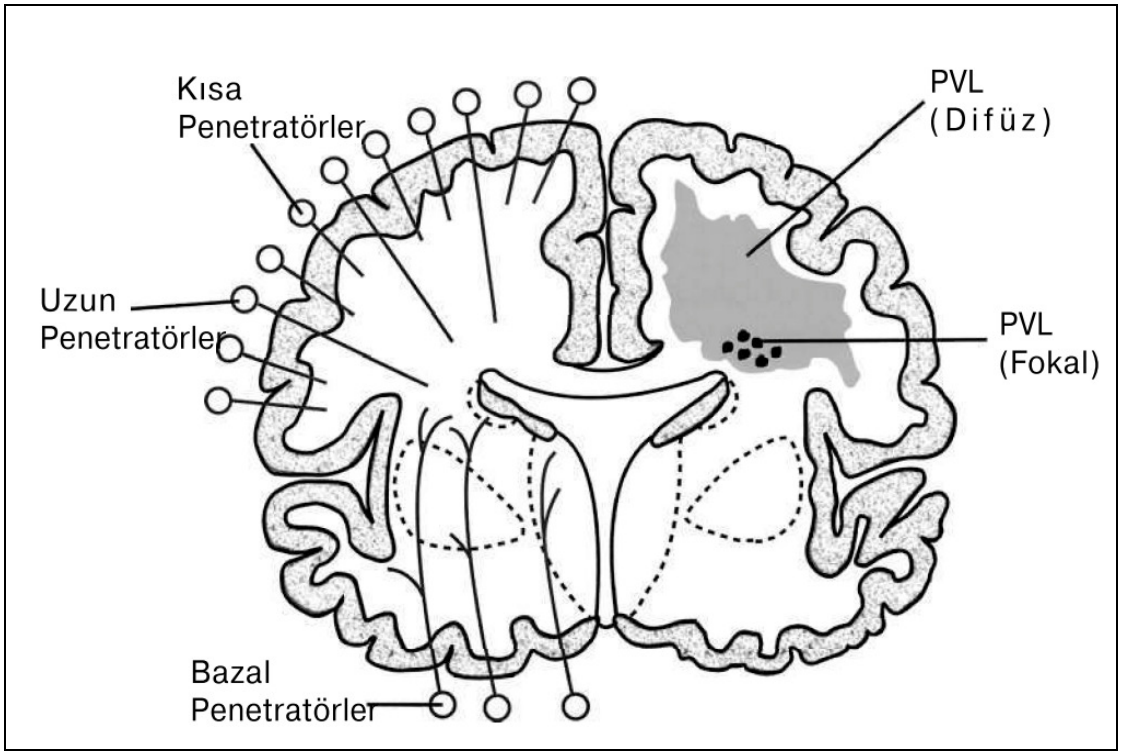
2.2 *Intraventriküler kanama*

2.3 *Oligodendrogliosit ölümünde glutamatın rolü*

3. Maternal-fetal infeksiyon/inflamasyon ve sitokin salınımı

1. Vasküler Anatomik ve Fizyolojik Faktörler

PVL'nin lokal ve diffüz komponentinin oluşumu büyük oranda serebral vasküler desteğin gelişimi ile ilişkilidir. Serebral beyaz cevherin vasküler desteği kısa ve uzun penetran arterlerden oluşmaktadır. PVL'nin fokal komponenti uzun penetran arterlerin uç kısımlarının dağılım bölgesinde meydana gelmektedir (Şekil 2).



Şekil 2 Koronal kesitte PVL fokal ve diffüz komponentlerinin ve serebral vasküler desteğin şematik gösterilmesi.

Preterm bebeklerde penetran arterlerin distal kısımları iyi gelişmemiştir. Serebral kan akımındaki değişiklikler bu bölgelerde ağır iskemiye neden olabilmektedir. Diffüz PVL uzun penetran arterler ile kısa penetran arterlerin dağılım bölgelerinde gelişmektedir. Serebral korteks tamamen gelişmeden kısa penetran arterler gelişimini tamamlamamaktadır. Serebral kan akımındaki azalma; öncül-OL'leri hedef alan daha spesifik bir hücre kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bu bebeklerde yapılan pozitron emisyon tomografi çalışmalarında, vasküler anatominin beyaz cevherde son derece düşük serebral kan akımına yol açtığı gösterilmiştir[13, 30].

Vasküler anatominin yanı sıra serebrovasküler akımın regülasyonundaki bozulma da serebral kan akımında azalma ve iskemiye yol açmaktadır. Matür bebeklerde ve yetişkinlerde sistemik kan basıncı azaldığında arteriyel vazodilatasyon, arttığında arteriyel vazokonstrüksiyon oluşarak serebral kan akımı geniş bir sistemik kan basıncı aralığında korunmaktadır. Oysa preterm bebeklerde serebral beyaz cevher kan akımı çok zayıf olduğu için bu kan akımının güvenlik sınırı da oldukça düşüktür. Klinik stabil preterm bebeklerde serebral akımda otoregülasyon kaybı daha az görülmektedir. Özellikle hasta preterm bebeklerde kan basıncının düşmesi ile birlikte serebral kan basıncı da

azalmaktadır. Sonuç olarak arteriyel uç ve sınır bölgelerde iskemi gelişmektedir[7]. Ağır hipotansiyon, belirgin hipokarbi, hipoplastik sol kalp hastalığı, retrograd serebral diastolik akımlı patent duktus arteriozus, ekstrakorporeal membran oksijenizasyonu gereken ağır hastalıklar gibi bozulmuş serebral kan akımı, PVL oluşumu ile ilişkilendirilmiştir[5].

Günümüzde modern yoğun bakım ünitelerinde non-invaziv bir yöntem olan near-infrared spektroskopi ile eş zamanlı serebral kan akımı gözlenebilmektedir. Sürekli near-infrared spektroskopik kayıt ile izlendiğinde hasta preterm bebeklerde serebral arteriyel kan akımı otoregülasyonunda ve serebral perfüzyonda sıklıkla bozulmalar olmaktadır. Çeşitli nedenlerle sistemik kan basıncındaki azalmalar önbeyin iskemisine zemin hazırlamaktadır[12].

2. Oligodendrosit Öncüllerinin Maturasyon Bağımlı Duyarlılıkları

Serbest Oksijen Radikal Hasarı

Yenidoğan ve fetal hayvan deney sonuçları gelişmekte olan beyinde iskemiden sonraki reperfüzyon fazında serbest oksijen radikallerinin arttığını ortaya koymaktadır. Hücre kültürü çalışmaları öncül-OL hücrelerinin serbest oksijen radikallerine karşı aşırı derece duyarlı olduğunu, ayrıca Vitamin E gibi anti-oksidan ajanların da serbest oksijen radikal saldırısına bağlı OL apopitozisini önlediği gösterilmiştir. Farklılaşmanın erken aşamasındaki OL serbest radikallere oldukça duyarlıyken maturasyon arttıkça duyarlılık azalmaktadır. Öncül-OL'ler matür hücrelerle kıyaslandığında serbest oksijen radikallerini biriktirdiği saptanmıştır. Özellikle glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi anti-oksidan savunma mekanizmalarının gelişiminde ve reaktivitesinde gecikme duyarlılığı arttırmaktadır. Bu defans mekanizmalarının yokluğunda hidrojen peroksid hücre içinde birikmekte ve Fe^{+2} varlığında Fenton reaksiyonuyla öldürücü hidroksil radikalleri oluşmaktadır. OL'lerin erken gelişim aşamalarında hücre farklılaşması için gerekli olan demir hücre içinde birikmektedir. Demir şelatörü desferoksamin kullanıldığında kültür ortamında öncül-OL'in serbest oksijen radikal hasarına daha dirençli olduğu görülmüştür[31].

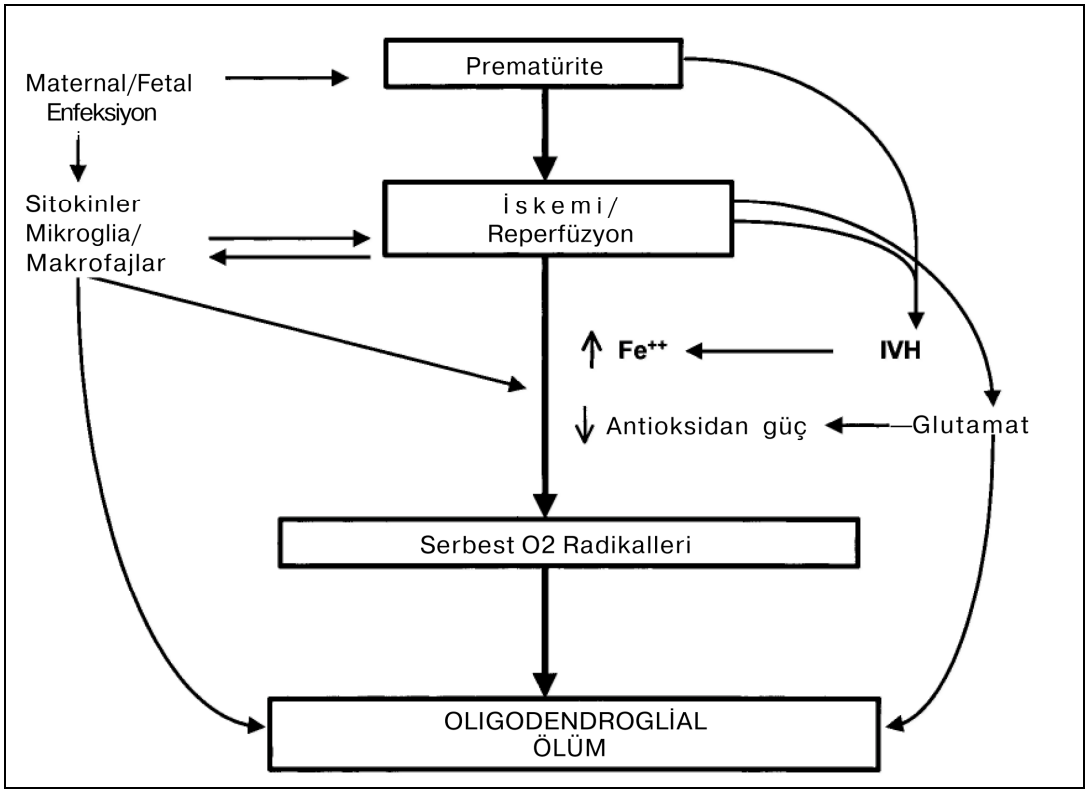
İntraventriküler Kanama:

İntraventriküler kanaması olan infantlarda PVL insidansının kanama olmayanlara göre arttığı görülmüştür. Bu birlikteliğin nedeni PVL ve intraventriküler hemoraji patogenezinde benzer faktörlerin rol oynamasındandır. Diğer bir olası nedense kanamanın serbest oksijen radikalleri oluşumu için zengin bir demir kaynağı oluşturmasıdır (Şekil 3).

Oligodendrogliosit Ölümünde Glutamatın Rolü:

Hipoksik iskemik olay sonrasında koagülasyon nekrozu ve akson hasarı neticesinde hücredışı alana çok yüksek miktarlarda glutamat sızıntısı olur. Astrosit ve nöronlarda glutamat geri alımının bozulması, astrosit ve oligodendrositlerdeki glutamat taşıyıcı fonksiyonların tersine dönmesine, ekstrasellüler glutamatın daha da artmasına neden olmaktadır. Glutamat reseptör aracılığı olmadan veya reseptör aracılı mekanizmalar yoluyla OL öncül hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır (Şekil 3). Reseptör aracılı olmayan mekanizmada glutamat, glutatyon eksikliğine ve serbest radikal aracılı hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu etki ile glutamat-sistin değişiminin aktivasyonu sonucunda sistin hücre dışına atılmaktadır. Hücre içinde sistin eksikliği, bozulmuş glutatyon sentezine neden olmaktadır. Bu etki Vitamin E gibi serbest oksijen radikali kurtarıcıları tarafından engellenebilmektedir[13, 32].

AMPA/kainite tipi glutamat reseptörlerinin aktivasyonu da invitro ve invivo olarak OL hücre ölümüne neden olmaktadır. İmmatür sıçan beyninde, hipoksik-iskemik hasar oluşturularak N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti uygulanması ile beyaz cevher hasarının önlendiği gösterilmiştir. Benzer koruyucu etki AMPA/kainite reseptör antagonisti, anti-epileptik bir ilaç olan topiramat ile de sağlanmıştır[13, 33, 34].



Şekil 3. PVL'de Oligodendrosit ölümü patogenezi: İVH, ekstrasellüler glutamat artışı, maternal-fetal infeksiyon veya inflamasyon sonucu gelişen serbest oksijen radikal radikallerinin merkezi rolü[13]

3. Maternal-Fetal infeksiyon/İnflamasyon ve Sitokin Salınımı

Maternal-fetal infeksiyonun ve inflamasyonun PVL patogenezinde rolü olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Şekil 3). Maternal, plasental veya fetal infeksiyon varlığında ve kord kanında veya amniotik sıvıda IL-6, IL-1 gibi sitokin düzeylerinin yükseldiği durumlarda PVL ve serebral palsi insidansı artmaktadır[13]. İnfeksiyona ve inflamasyona bağlı artan plasental inflamatuar mediatörler ve mikroorganizmalar, fetal dokulara ulaşarak neonatal hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır[35].

Sıçanlarda LPS'in intraperitoneal veya serviks içine enjeksiyonu intrauterin inflamasyona neden olarak, yavru sıçan beyninde proinflamatuvar sitokin salınımına neden olmakta ve PVL'ye benzer beyaz cevher hasarına yol açmaktadır. Miyelinizasyon ve astrogliozis üzerine olumsuz etkilere neden olmaktadır[36, 37]. Endotoksin, vasküler endotel bütünlüğünün bozulmasına, arteriyel hipotansiyona, serebral vasküler akımın azalmasına ve iskemiye neden olmaktadır. Salınan vazoaktif sitokinler serebrovasküler otoregülasyonun bozulmasına katkıda bulunmaktadır[38]. Gebe sıçanlara 19-20. günlük iken E.coli LPS uygulaması ile yavrularının beyninde anlamlı IL-6, IL-1 ß, TNF-α ekspresyonu ve striatum düzeyinde apopitotik hücre (Tunel-pozitif hücre) artışı saptanmıştır[39-42]. İnfeksiyon ve inflamasyon doku perfüzyonunda bozulmaya, iskemi-reperfüzyon hasarına yol açmaktadır. Bu durum OL hasarı için zemin hazırlamaktadır.

Erken membran rüptürlü (EMR) anne bebeklerinde biyofizik aktivitede azalma gözlenmektedir. IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler santral sinir sistemine doğrudan etki ederek vücut hareketlerinde azalmaya yol açmaktadır. TNF-α ve IL-1 ile başlatılan PG-E sentezi total solunum hareketlerini azaltmaktadır[43]. Biyofizik aktivitede azalma fetal inflamatuar yanıt sendromunun fetal bir bulgusu olabilmektedir. Prematüre eylem veya EMR'de miyometrial kontraksiyon, servikal dilatasyon, membran ve desidual aktivasyon annenin infeksiyona cevabıdır. Kistik PVL ve korioamnionit arasında anlamlı ilişki olduğu bildirilmiştir[44, 45]. Erken nörolojik prognozu belirlemede histolojik korioamnionitin klinik korioamnionite göre daha güvenilir olduğu, çünkü klinik bulguların silik olabileceği vurgulanmıştır. Histolojik korioamnionitli vakalarda PVL, İVH (evre > 3) ve neonatal konvülsiyon sıklığı artmıştır[46].

Doğru yaklaşımın tokoliz ve antibiyotik tedavisi mi yoksa erken doğum mu olduğu tartışmalıdır. Zaten korioamnionit varlığında tokolizin başarısızlığı da fetusun bu kötü intrauterin ortamdan bir an önce kurtulmak istemesi şeklinde yorumlanabilmektedir[47].

İmmün yanıtın modüle edilmesi bebeği iskemik veya infeksiyöz kaynaklı inflamatuar zedelenmeden koruyabilir. Bu konuda yapılacak yeni araştırmalar kalıcı organ zedelenmesini önlemekte yeni bilgilere ulaşmamızı sağlayacaktır.

PERİVENTRİKÜLER LÖKOMALAZİNİN ÖNLENMESİNE YÖNELİK UYGULAMALAR

Klinik Uygulamalar

PVL patogenezi göz önünde bulundurulduğunda, serebral perfüzyonun korunması gerekmektedir. Otoregülasyon korunmuş dahi olsa serebral iskemiye neden olabilecek ağır hipotansiyon, belirgin hipokarbi gibi durumlardan kaçınılmalı, bunun yanı sıra serebral otoregülasyonu bozabilecek orta ağırlıkta hipoksemi ve hiperkarbiden de sakınılmalıdır[13]. Kan gazı değerlerinin takibi ve arteriyel CO2 değerlerinin 35 mmHg'nın altına düşmesinin engellenmesi serebral palsi riskini düşürmektedir. Klinik olarak güvenilir, Vitamin E gibi anti-oksidanların kullanılması faydalı olabilir ancak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır[13].

Deneysel Yaklaşımlar

PVL önlenmesinde deneysel çalışmalar umut vericidir. İmmatür sıçan beyninde hipoksi-iskemi oluşturulduktan sonra öncül-OL glutamat reseptörlerine yönelik tedaviler NBQX(2,3 didroksi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline-2,3dion) veya topiramat tedavisi PVL bulgularını hafifletmiştir. Her iki ilaç da AMPA aracılı kalsiyum yükünü ve mitokondrial fonksiyon bozukluğunu inhibe etmektedir. Oligodendrosit hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda, GluR2-serbest AMPA reseptörlerinin spesifik inhibitörlerinin ve metabotropik glutamat reseptör aktivatörlerinin belirgin anti-eksitotoksik etkileri saptanmıştır[12, 13, 33]. NMDA reseptör agonisti ibotenate enjekte edilerek eksitotoksik beyin hasarı oluşturulan yavru farelerde diazepam, fenitoin, karbamazepin gibi anti-konvülzanların nöron koruyucu etkisi gözlenmezken topiramatın apopitozisi ve mikroglial aktivasyonu azalttığı, öncül-OL üzerine koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir[48]. Preterm bebeklerde hiperoksinin kronik akciğer hastalığı ve prematüre retinopatisine yol açtığı bilinmektedir. Gelişmekte olan beyin dokusunda hiperoksinin apopitozisi arttırdığı, hiperoksik beyin hasarına yol açtığı gösterilmiştir[49]. Topiramatın hiperoksik beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir[34].

PVL önlenmesinde diğer bir potansiyel tedavi metodu serbest radikal oluşumunun ve inflamasyonun önlenmesidir. Üçüncü trimesterde anne sıçanların anti-oksidan ve glutatyon öncüsü N-asetil sistein ile tedavisi santral sinir sistemine proinflamatuar sitokin

istilasını inhibe ederek maternal lipopolisakkarit uygulaması sonucu gelişen öncül-OL hücre kaybını azaltmıştır[12].

Minosiklin, ikinci jenerasyon bir tetrasiklin türevi olup kan-beyin bariyerini aşabilmektedir. Antibiyotik ve anti-inflamatuar bir ilaç olarak kanıtlanmış etkileri mevcuttur. Mikroglial aktiviteyi baskılayarak PVL'nin de içinde olduğu bir dizi nörolojik hastalıkta nöroprotektif etkisi saptanmıştır. Ancak miyelin toksisitesi yaratılan bir modelde oligodendroglial rejenerasyonu önlemesi ve amyotrofik lateral sklerozisle ilişkili geniş bir faz-3 çalışmasında da minosiklin alan grupta plasebo grubuna göre beklenmedik şekilde hızlı progresyon görülmesi nedeniyle güvenilirliği sorgulanmaktadır[12].

Anti-inflamatuar, analjezik, anti-trombotik ve anti-mitojenik etkileri ile bilinen omega-3 yağ asitinin, gebelikte uygulanması ile hayvan PVL modelinde BBC hasarının azaldığı gösterilmiştir[50]. Benzer bir modelde anti-koagülan, anti-inflamatuar, anti-apopitotik, anti-oksidan ve hücre koruyucu etkili aktive protein C'nin antenatal kullanımının inflamatuar sitokinleri ve BBC hasarını azalttığı bildirilmiştir[41].

Birçok fizyolojik olayda rol oynayan leptinin hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde apopitozisi azalttığı, nöron sayısını koruduğu bildirilmiştir[51].

Öncül-OL'lere ve immatür nöronlara trofik etkisi olan, oksidan, eksitotoksik ve inflamatuar mediatörlere karşı direnci arttıran ilaçların kullanımı da uzun yıllardır çalışılmaktadır. Bu ilaçlar içinde üzerinde en çok çalışılanı eritropoietin olup serbest radikallerin, eksitotoksinlerin, inflamatuar mediatörlerin etkilerini antagonize ettiği, hem lipopolisakkarit, hem de hipoksi-iskemi ile indüklenmiş PVL modellerinde etkili olduğu gösterilmiştir[42, 52-58].

Antenatal dönemde uygulanan magnezyum sülfatın vazodilatör, anti-oksidan, anti-sitokin etkilerinden dolayı PVL'yi önlemede etkili olduğu öne sürülse de potansiyel faydaları ve güvenilirliği açısından sorgulanmaktadır[13].

Antenatal steroid uygulamasının yararlı etkilerinin olabileceği düşünülse de antenatal ve erken dönemde postnatal deksametazon kullanımının serebral palsi insidansını arttırdığı gözlenmiştir[13].

Günümüzde PVL sıklığını ve neden olduğu nörolojik morbiditeleri azaltmak için henüz spesifik bir tedavi yöntemi yoktur.

PENTOKSİFİLLİN

Pentoksifillin sentetik teobromid derivesi olup, yapısal olarak teofilin ve kafein gibi metilksantin türevidir. Son 2 dekatta infeksiyonlarda, vasküler ve inflamatuar hastalıklarda, sepsis ve multiorgan yetmezliğinde non-steroidal immünmodülatör ajan olarak kullanılmaktadır. İmmünmodülatör etkisi ile, pretermlerde inflamatuar sitokin kaskatının aktive olduğu, serbest radikallerin toksik etkilerinin görüldüğü ve mikro dolaşımın bozulduğu sepsis, nekrozitan enterokolit (NEK) ve bronkopulmoner displazi (BPD) gibi hastalıklarda yararlı etkileri gözlenmiştir[59].

Etki Mekanizması

Pentoksifillin eritrosit fosfodiesteraz inhibisyonu ile hücre içi cAMP artışına yol açmaktadır. Eritrosit esnekliğini, fibrinolitik ve doku plazminojen aktivatörlerinin aktivitesini arttırırken trombosit adezyonunu inhibe etmektedir. Bu etki ile kan viskositesi azalırken, mikro dolaşım ve doku perfüzyonu düzelmektedir. Ayrıca TNF-α, IL-6, INF-ɣ gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimini ve salgılanmasını azaltmaktadır. Endojen prostasiklini aktif hale getirerek anti-agregan ve vazodilatatör etkiye katkıda bulunmaktadır. PTX'in nötrofil süperoksit salınması üzerine düşük dozlarda arttırıcı, yüksek dozlarda azaltıcı olmak üzere her iki yönde etkisi olduğu görülmüştür[59].

Hücre içi cAMP'i arttırıcı etkisi ile, artmış lökosit ve eritrosit deformitesine karşı koruyucu etkilidir. Sepsisde protein C ve S sistemini koruyarak anti-koagülan sistemin aktif kalmasını sağlamaktadır[60]. Trombosit adezyonunu arttırmamakta veya fonksiyonlarını bozmamaktadır. İntestinal hücrelerdeki hücreler arası bağları güçlendirmekte, bariyer etkisini arttırmakta ve TNF-α, INF-ɣ, IL-1 gibi sitokinlerin oluşturduğu hasara karşı korumaktadır[61]. Deneysel olarak yanık sonrası uzak organ etkilenmelerinden olan intestinal permeabilite artışını azaltmıştır[62]. Belki de bu etkisi nedeniyle mukozal bütünlüğün ve geçirgenliğin bozulduğu NEK'de faydalı olmaktadır.

Farmakokinetik

PTX suda ve etil alkolde çözülebilmekte ve kanda %70 proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Erişkinde intravenöz uygulama sonrası 5. dakikada pik konsantrasyona ulaşmaktadır. Primer olarak redüksiyon ile metabolit I'e ve oksidasyon ile de metabolit III ve IV'dönüşmektedir. Metabolit IV % 45 böbreklerde ekskrete edilirken metabolit III %5 kadar ekskrete edilmektedir[59, 63].

Szymura-Oleksiak ve arkadaşları yenidoğanda 30 mg/kg/6 saatlik infüzyonu ile elde edilen konsantrasyonun, erişkin septik şok tedavisi ile elde edilen konsantrasyona

benzer olduğunu bildirmiştir. Ayrıca 60 mg/kg/12 saatlik infüzyon ile hem PTX hem aktif metabolitlerin konsantrasyonunda anlamlı artış olduğunu ancak belirgin yan etki artışı olmadığını da bildirmiştir[64].

PTX sepsis ve septik çok gelişen yenidoğna bebeklerde bozulmuş mikrodolaşımın tedavisinde önermiştir[65, 66]. Nebülize PTX beş preterm BPD'li infantta günde 4 kez 10 mg/kg/doz uygulanmasıyla oksijen ihtiyaçlarını azalttığı bildirmiştir. Ayrıca nebülize uygulamanın 60 mg/kg/gün intravenöz uygulamadan 20 kat daha az bir kan düzeyi oluşturduğunu gözlemlenmiştir[67].

Yan Etkileri

Teobromid metilksantinler içerisinde en az toksik olanıdır. Teobromid derivesi olarak PTX'nin de yan etkileri azdır. Diğer metil ksantilerde olduğu gibi taşikardi, aritmi, hipotansiyon, bronkodilatasyon, irritabilite, tremor, konvülsiyon gibi yan etkiler terapotik dozlarda çok nadirdir[59].

Erişkin serebral ve retinal hemorajili hastalarda eritrosit, trombosit ve plazma fibrinojen düzeylerine olan etkileri nedeniyle kontrendikedir. Preterm bebeklerin İVK'ya yatkın olduğu bilinmektedir. Ancak 117 ağır septik preterm bebekte kullanımı sonrası kanama, trombositopeni gibi yan etkilerin gözlenmediği bildirilmiştir[59]. PTX alan 34 olundan hiçbirinde kanama görülmezken plasebo grubundaki 30 olgunun 4'ünde kananma görülmüştür[64]. NEK nedeniyle cerrahi tedavi uygulanan vakalarda, pentoksifillin tedavisi öncesinde ve sonrasında kranial USG da %73 oranda değişiklik saptanmamıştır. Yine de preterm bebekler yeni IVK veya eski kanamada artış açısından dikkatli izlenmelidir[59].

Toksik etkiler 80 mg/kg/doz üzerindeki alımlarda gözlenmiştir. Flaşing, ateş, hipotermi, ajitasyon, myoklonus, dikkat eksikliği, konvülsiyon, hipotansiyon, bradikardi, atrioventriküler blok, asistoli gibi akut toksik etkiler gözlendiği bildirilmiştir. Bilinen bir kronik toksik etkisi bulunmamaktadır. Hipotansiyon, periferal dilatasyona bağlı olduğundan α-adrenajik ilaçlar faydalı olabilmektedir[59].

PTX'in plasentadan fetusa transportu hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Yüksek dozlarda fetal emilimin gerçekleştiği bilinmektedir. Günümüze kadar teratojenik etki bildirilmemiştir. Hayvan çalışmalarında yüksek dozda meme dokusunda benign fibroadenom geliştiği bildirilmiştir. "U.S.A Food and Drug Administration"' nın gebelikte ilaç kullanımı ile ilgili olarak bildirdiği kategoriye göre C sınıfında yer almaktadır[68].

Pentoksifillinin Yenidoğanda Kullanım Alanları

Sepsis: Yapılan çalışmalarda PTX tedavisi verilen geç sepsisli, 36 haftanın altındaki preterm infantlarda mortalitenin azalmasının yanında, IL-6, TNF-α düzeylerinin

daha az yükseldiği, metabolik asidoz, oligüri, anüri, hipotansiyon, NEK gelişimi gibi klinik bulguların daha az olduğu bildirilmiştir[59]. Sepsisteki kullanımı ile ilgili, yararlı olmadığını bildiren az vakalı bir çalışma olsa da, Cochrane metaanalizinde 107 vakayı içeren 2 randomize kontrolü çalışma sonucuna göre PTX ile tedavi edilen her 6 hastadan 1'inde herhangi bir yan etki görülmeksizin mortalitenin engellediği gösterilmiştir. Tedavinin umut verici olduğu ancak randomize kontrollü çalışmalara da ihtiyaç olduğu bildirilmiştir[69, 70].

Bronkokopumoner displazi: Deneysel olarak PTX'in hiperoksik akciğer hasarını azaltmada tek başına yeterli olmadığı, montelukast ve klaritromisin ile birlikte kullanıldığında ancak plaseboya üstünlük sağladığı gösterilmiştir[71]. İlk 72 saat boyunca %30'dan fazla FiO_2 ihtiyacı olan veya mekanik ventilatör desteği alan 150 ÇDDA infantta deksametazon veya PTX tedavisi kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Mortalite oranlarının her 3 grupta benzer olduğu, BPD gelişme riskinin ise deksametazon ve PTX tedavisi alan gruplarda, kontrol grubuna göre azalmış olduğu bildirilmiştir[72]. Yine postnatal yaşı 43 günden büyük BPD nedeniyle oksijen ihtiyacı devam eden 5 vakanın 4 tanesinde PTX tedavisi ile oksijen ihtiyacı azalmıştır[67]. Başka bir çalışmada geç dönemde 30 günden fazla oksijen ihtiyacı olan BPD'li infatta da deksametazon ile PTX tedavisi karşılaştırıldığında her iki grupta da oksijen ihtiyaçlarında azalma eğilimi gözlenmiştir[72].

Nekrotizan enterokolit: Evre III NEK ve multi organ yetmezlikli 20 olguda **s**epsis ve organ yetmezlik skoru ile %94 mortalite tahmin edilmiş, ancak PTX tedavisi ile mortalite %55 olarak gerçekleşmiştir[73]. Yine yapılan hayvan deneyi modelinde NEK insidansını %50 azaltıp, plaseboya göre evre III NEK görülme oranını 5'de 1 oranında azalttığı saptanmıştır[74]. Hipoksik hasar ile oluşturulan başka bir NEK modelinde ise hipoksi öncesi PTX uygulamasının NEK gelişimini engellemediği, kontrol grubuna göre anti-oksidan enzimlerin hipoksi ve hipoksi+PTX grubunda arttığı gösterilmiştir. Ancak intestinal lezyonların derecesinin PTX tedavisi alan grupta daha iyi olduğu bildirilmiştir. Sadece hipoksi uygulanarak NEK modeli oluşturulması, NEK etiyolojisinde ise birçok farklı faktörün rol alması nedeniyle sonuçların yetersiz olabileceğini düşündürmüştür[75]. Halen bu konuda çok merkezli, randomize, kontrollü iki klinik çalışma devam etmektedir[59].

Persistan pulmoner hipertansiyon (PPHN): Fosfodiesteraz inhibitörü olması nedeniyle pulmoner vazodilatasyon etkisi ile PPHN'da yararlı olabileceği öngörülmüşse de bu açıdan yeterli bilgi ve çalışma mevcut değildir[59].

Mekonyum aspirasyon Sendromu (MAS): MAS'lı hayvan modelinde PTX tedavisinin bronkoalveoler lavajdaki makrofaj sayısının, TNF-α ve protein konsantrasyonlarının artmasını engellediği, ancak nötrofil sayısında kontrol grubu ile bir fark olmadığı bildirilmiştir. Başlangıçta benzer olmasına rağmen PTX grubunda 4., 6. ve 12. saatlerde daha iyi ventilasyon parametrelerine ulaşıldığı bildirilmiştir[76]. Ancak MAS'da yapılmış klinik bir çalışma mevcut değildir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Üç yetişkin Wistar cinsi dişi sıçan seçilerek, vajinal smearda östrus dönemi saptanarak katıma bırakıldı. Katım günü hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Hayvanlar 12 saat karanlık-12 saat gün ışığı siklusunda bırakılarak, 20-25ºC ısı, %50 nem, standart besin ve su ile beslendi.

PVL modelinin oluşturulması:

LPS (Escherichia coli, serotype 055:B5, Sigma), pirojen-free salin (PFS) içerisinde süspansiyon şeklinde hazırlandı. Stok LPS solüsyonu sonikasyon ve aliquasyon işlemlerinden sonra kullanılıncaya kadar –70°C'de saklandı.

Lipopolisakkaritle indüklenen PVL modeli için anne sıçanlara gestasyonun 18. ve 19.gününde 500 mikrogram/kg intraperitoneal (i.p.) LPS verilerek PVL modeli oluşturuldu[37, 42].

Pentoksifillin Uygulaması:

Daha önce literatürde belirtildiği gibi anneye Pentoksifillin (Trental ampul 300 mg/15cc) 60 mg/kg dozda intraperitoneal olarak gestasyonun 18. ve 20. günleri arasında toplam 3 doz uygulandı[77, 78].

Çalışma Grupları:

Grup I (LPS): LPS uygulanarak PVL oluşturulan yavrular

Grup II (LPS+PTX): LPS uygulanarak PVL oluşturulan ve PTX uygulanan yavrular

Grup III (SF): Kontrol grubu için serum fizyolojik uygulanan yavrular

İki anneye inflamasyonla indüklenmiş PVL modeli oluşturmak için gestasyonun 18. ve 19. günlerinde 500 mikrog/kg dozunda intraperitoneal LPS uygulandı. Bir anneye LPS uygulamasından 30 dakika önce 60 mg/kg/doz intraperitoneal PTX verildi. Son LPS uygulamasından 24 saat sonra bir doz daha enjekte edilerek toplam 3 doz PTX uygulandı. Kontrol grubundaki anneye ise eşit volümde intraperitoneal SF uygulandı.

Anneleri tarafından emzirilen yavrular postnatal 7.günde eter anestezisi altında %4 paraformaldehit ile transkardiyak perfüzyonla fikse edilerek beyinleri çıkarıldı. Çıkarılan beyinler %10 paraformaldehit içerisinde histolojik ve immun-histokimyasal inceleme için DEU Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına iletildi.

Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü

Beyin dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemine başlandı. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, 60˚C de etüvde 20'şer dakika sırasıyla %70, %80, %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60˚C de etüvde 20'şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Ardından şeffaflandırma amacıyla 60˚C de etüvde 30'ar dakika iki değişim ksilolde bekletildi. 60°C'lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak ince doku dilimleri parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 1). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5 μm'luk koronal kesitler alındı. Kesitler rat beyin atlasına (Paxinos ve Watson rat atlası) göre periventrilüler bölgeden 13-15-17. düzlemlerden alındı.

Her deneğe ait kesitlerin bir kısmı doku immunohistokimyasal yöntemler ile myelin basic protein ile boyanırken, apopitozisin belirlenmesi ve değerlendirilmesi için Tunel ve aktive kaspaz-3 immunhistokimya uygulandı.

Tablo:1 Rutin Doku Takibi

İşlem	**Madde**	**Süre**
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

Myelin-basic-protein İmmunreaktivitesi

Myelin-basic-protein (MBP), immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla MBP antikoru kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60ºC lik etüvde 1 gece ve 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden

kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Sitrat buffer (pH:6) içerisinde ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. Kesitler 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-MBP 1.100 (SC-71546, Santa Cruz Biotechnology, USA) antikoru ile +4^{o}C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk. enkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

Apopitozisin belirlenmesi ve değerlendirilmesi:

Apopitozis, her bloktan elde edilen beyin doku kesitlerinde tunel ve aktive kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama ile değerlendirildi. Kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmantasyon, sitoplazmanın büzüşmesi ve apopitotik cisimlerin oluşumu apopitotik hücrelerin temel özellikleri olarak kabul edilerek kesitler incelendi.

İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'den 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendi. İmmunreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi. Sayım sonucu elde edilen sonuçların ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Ayrıca periventriküler alanda 1000 hücre sayıldı. Tunel pozitif hücrelerin yüzdesi (apopitotik hücre yüzdesi) hesaplandı.

Tunel reaksiyonu:

Apopitozise giden hücre çekirdeklerinde DNA fragmantasyonu saptanması için parafin kesitlere terminaldeoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (Tunel) reaksiyonu uygulandı. Apopitotik hücre saptamasında DeadEnd Colorimetric Tunel sistem kiti (Roche, Germany) kullanıldı. Kesitler 5 μm kalınlığında deparafinize edildi. Deparafinizasyon sonrası kesitler 15 dk. 20 μg/ml proteinaz K ile işleme sokuldu. PBS ile yıkandıktan sonra kesitler Tunel reaksiyon karışımında 37°C'de 60 dakika bekletildi. Daha sonra converter POD solüsyonu uygulandı. Reaksiyonun görünür hale

getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi:

Aktive kaspaz-3, immunreaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla aktive Kaspaz-3 antikoru kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60ºC lik etüvde 1 gece ve 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Sitrat buffer (pH:6) içerisinde ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti anti-kaspaz 3 aktive form 1:100 (AB3623, Millipore) antikoru ile +4^{o}C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk. enkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

Görüntü Analiz Metodu

Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image software). Tüm kesitler (her doku için en az 4 kesit) analize edilerek; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskobunda (Olympus BX-51 Tokyo, Japan) incelenerek, görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktarıldı (Olympus DP-71, Japan). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı.

Veri Analizi ve İstatistik:

İstatistik analiz SPSS for Windows istatistik programı kullanılarak yapıldı; sonuçlar ortalama ± standart sapma biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U-testi kullanıldı ve $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Uygulanan tedavilerden yaklaşık 24 saat sonra doğan yavrular değerlendirildi. Yeterli doz tamamlanmadan veya 24 saatten daha kısa sürede doğan gebenin yavruları çalışmaya alınmayarak deney tekrarlandı. Grup I'de LPS uygulanan gebenin 10 yavrusu olup 2 yavru doğum sırasında veya doğumdan hemen sonra kaybedildi. Benzer şekilde Grup II'de LPS+PTX uygulanan gebenin 11 yavrusu olup 2 yavru doğum sırasında veya doğumdan hemen sonra kaybedildi. Bir yavruda ise gelişme geriliği gözlendiği için çalışmaya alınmadı. Kontrol gurubunda ise 9 yavru olup 7 yavru çalışmaya alındı. Diğer 2 yavru çalışma dışı bırakıldı. Doğum sonrası yavruların fiziksel aktiviteleri benzer olarak değerlendirildi.

Yavru ratlar 7.gününde sakrifiye edildi. Öncül-OL'lerin hasarına bağlı hipomiyelinizasyonun değerlendirilmesi amacıyla MBP ve apopitozisin değerlendirilmesi amacıyla kaspaz-3 ve tunel immunohistokimyasal yöntemleri kullanıldı. Beyin ve vücut ağırlıkları ölçüldü.

MBP boyanması ile miyelinizasyon skorlandığında LPS uygulaması ile miyelinizasyon kontrol grubuna göre belirgin azalmıştı (Grup I ve Grup III $p < 0.05$). Ancak LPS uygulaması ile birlikte PTX uygulamasının hipomyelinizasyonu azalttığı, yalnız LPS uygulanan grup I'e göre MBP immün skorunun daha yüksek olduğu görüldü (Grup I ve grup II $p<0.05$). Ayrıca kontrol gurubu ile grup II (LPS-PTX) arasında MBP immün skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Grup II ve Grup III $p>0.05$) (Tablo 2, Grafik 1, Resim 1).

Beyin / vücut ağırlık oranları değerlendirildiğinde tüm grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğu ve sırası ile grup III'ün grup II'den ve grup II'nin de grup I'den daha yüksek orana sahip olduğu saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 2, Grafik 2).

Tunel ve kaspaz-3 ile apopitozis değerlendirildiğinde LPS uygulamalarının immünhistokimyasal skorları ve apopitotik hücre yüzdelerini arttırdığı görüldü. PTX uygulamasının ise bu apopitozisi azalttığı görüldü (Grup I ve II $p < 0.05$). Apopitotik hücre sayımında 3 grup arasında istatistiksel fark saptandı (Tablo 3). Ancak kontrol grubuna göre grup II (LPS+PTX)'de daha yüksek apopitozis immün skor değerleri gözlenmekle birlikte immün histokimyasal skorları açısından istatistiksel fark saptanmadı (Grup II ve grup III $p > 0.05$) (Tablo 3, Grafik 3, Grafik 4, Grafik 5 Resim 2, Resim 3).

Tablo 2: Gruplar arası MBP immün skoru ve Beyin/vücut ağırlığı verileri

	MBP İmmün Skoru	Beyin / Vücut Ağırlığı
Grup I: PVL	1,25±0,46	0,61±0,017 / 11,5±0,2
Grup II: PVL+PTX	2,25±0,46	0,64±0,015 / 11,6±0,3
Grup III: Kontrol	2,71±0,48	0,73±0,016 / 12,8±0,3
P		
Grup I ve II	0,003	0,004
Grup II ve III	0,082	0,036
Grup I ve III	0,001	0,001

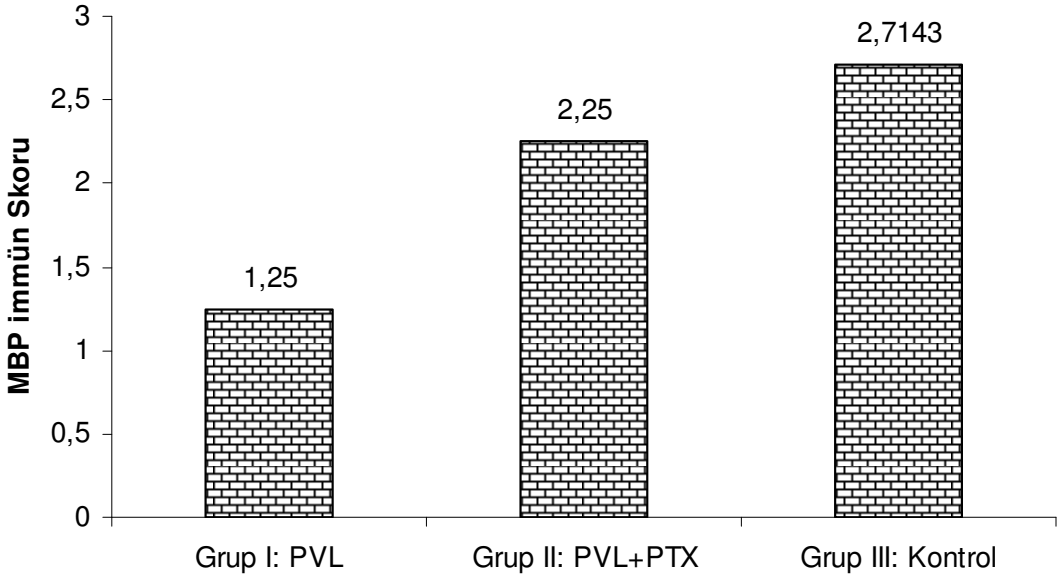
Ortalama ± SD

Tablo 3: Gruplar arası tunel ve kaspaz-3 immün skorları ve apopitotik hücre yüzdesi

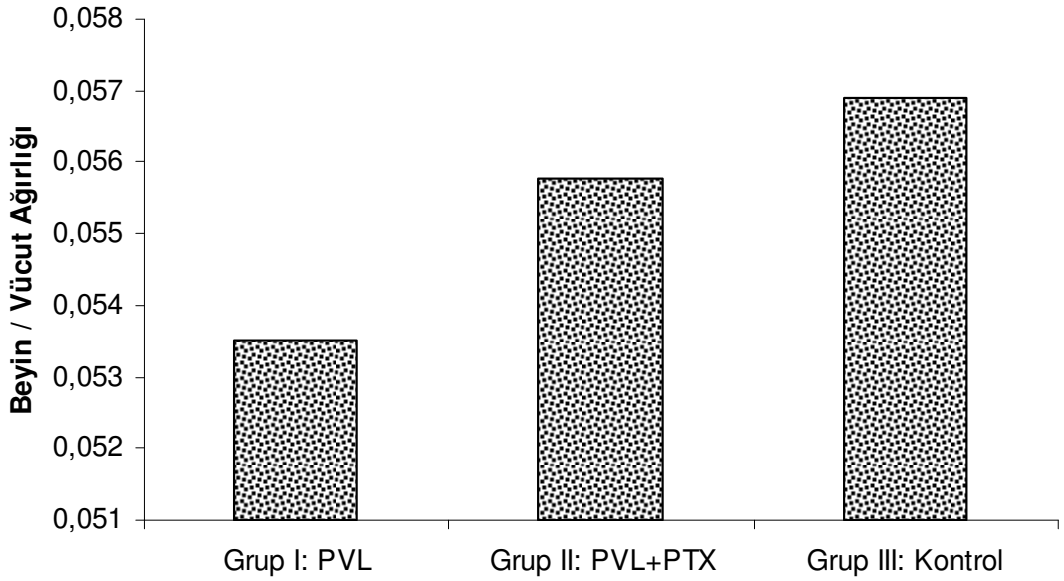
	Tunel İmmün Skoru	Kaspaz-3 İmmün Skoru	Apopitotik Hücre Yüzdesi (%)
Grup I: PVL	2,50±0,53	2,375±0,51	35,2±2,2
Grup II: PVL+PTX	1,37±0,51	1,25±0,46	21,8±1,9
Grup III: Kontrol	0,85±0,37	0,71±0,48	15,1±1,8
P			
Grup I ve II	0,003	0,002	0,001
Grup II ve III	0,052	0,053	0,01
Grup I ve III	0,001	0,001	0,01

Ortalama ± SD

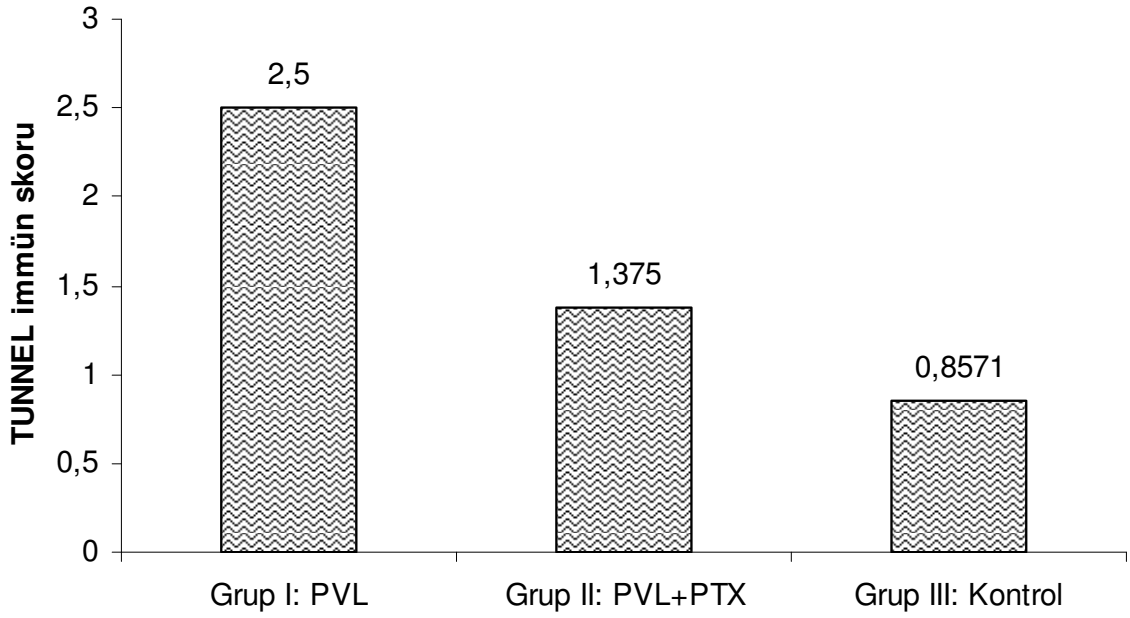
Grafik 1: MBP immün skoru değerleri



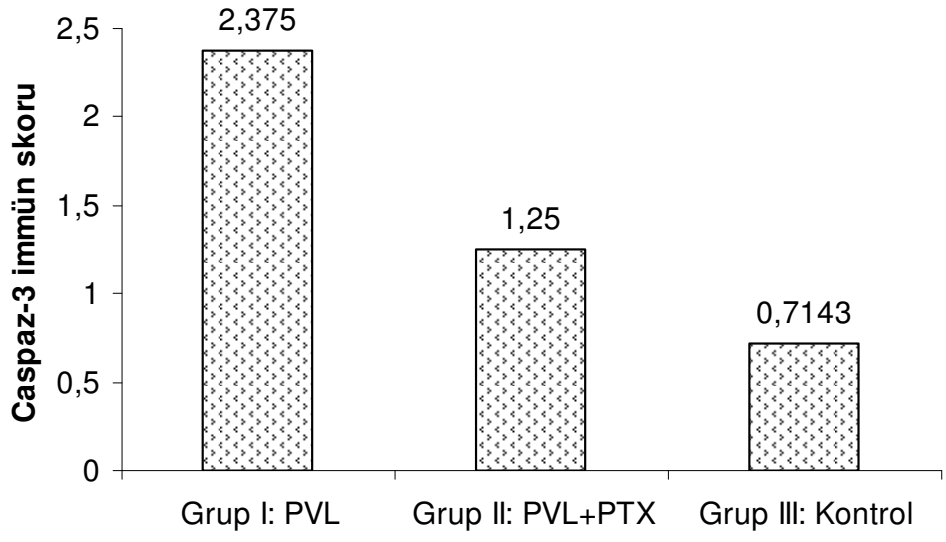
Grafik 2: Gruplar arası beyin/vücut oranları



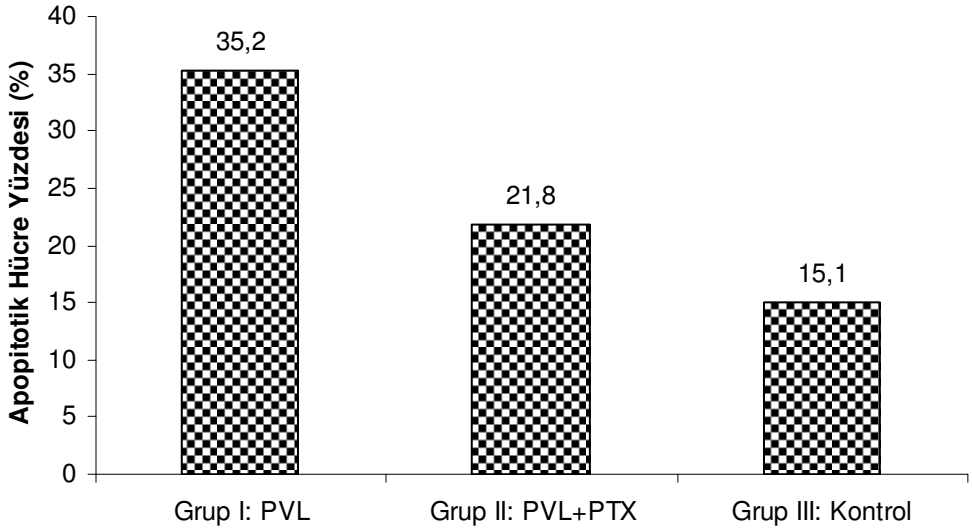
Grafik 3: Tunel immün skor değerleri



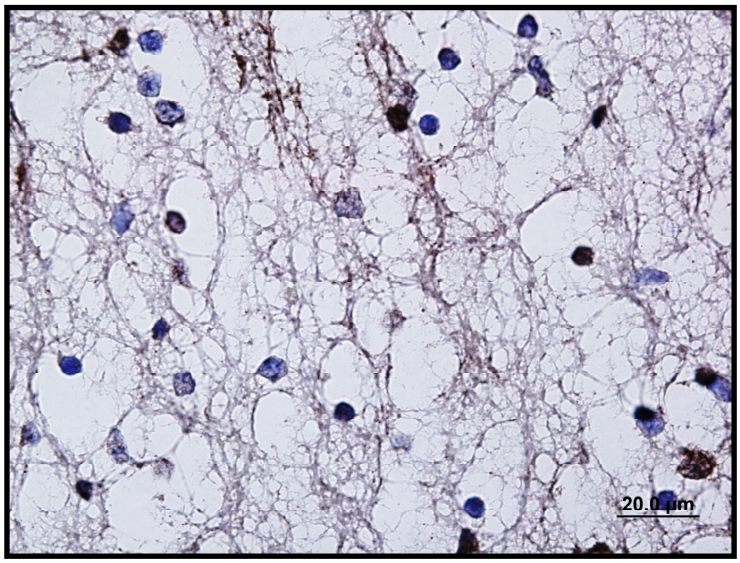
Grafik 4: Kaspaz-3 immün skor değerleri



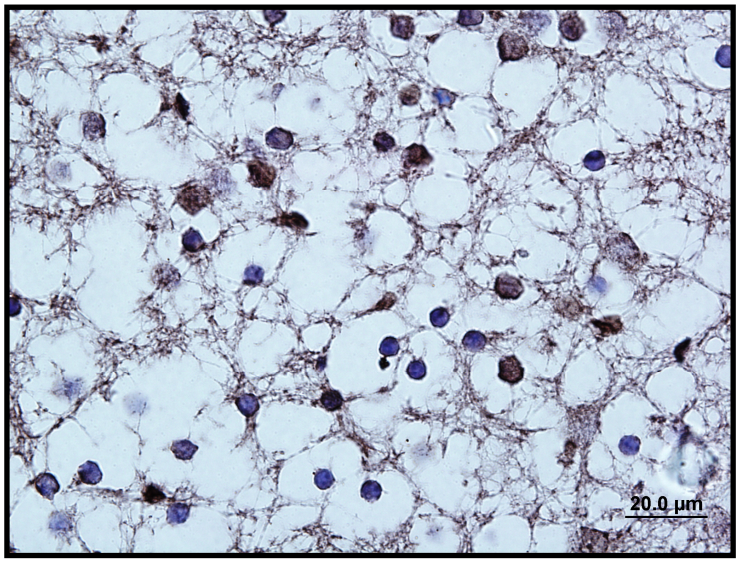
Grafik 5: Apopitotik hücre yüzdesi



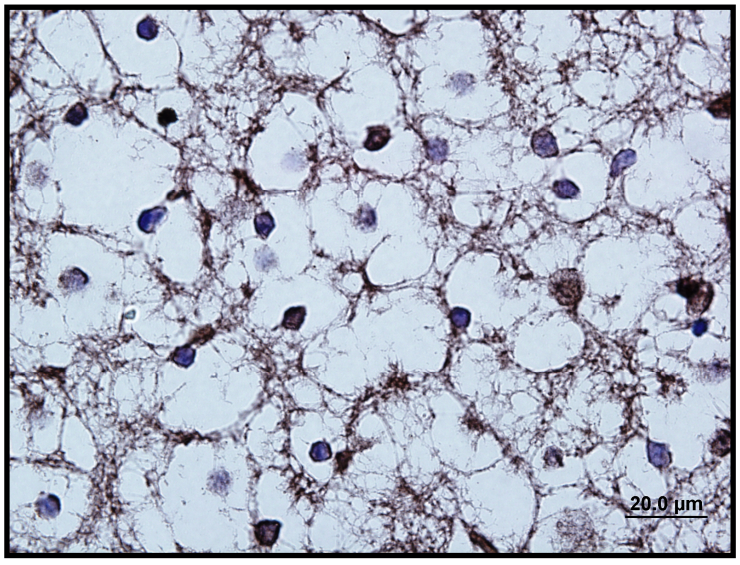
Resim 1: Periventriküler Alan Miyelin Basic Protein immunreaktivitesi



Grup I (LPS)

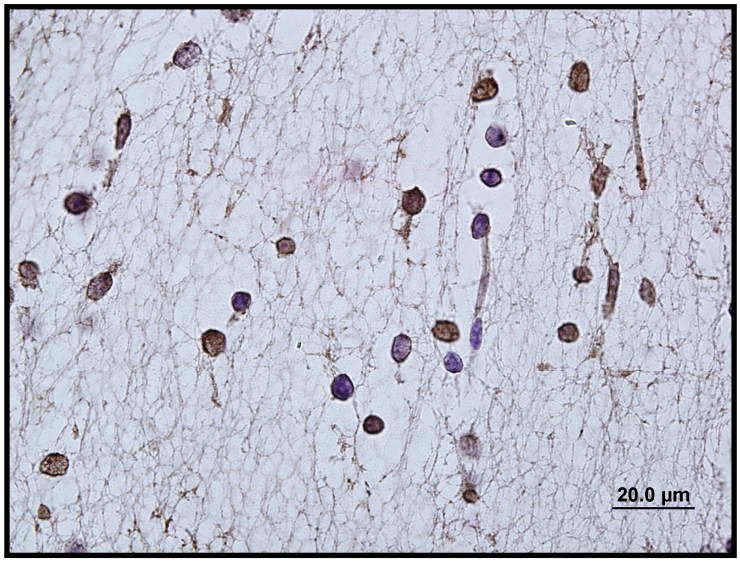


Grup II (LPS+ PTX)

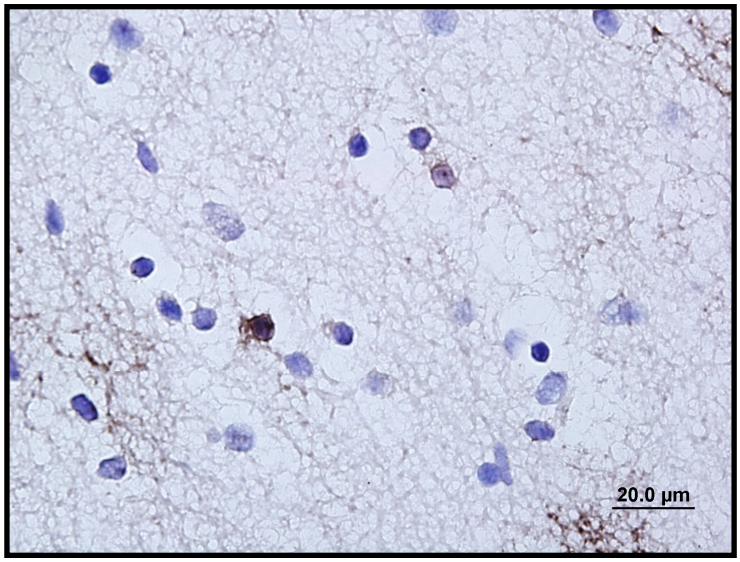


Grup III (Kontrol)

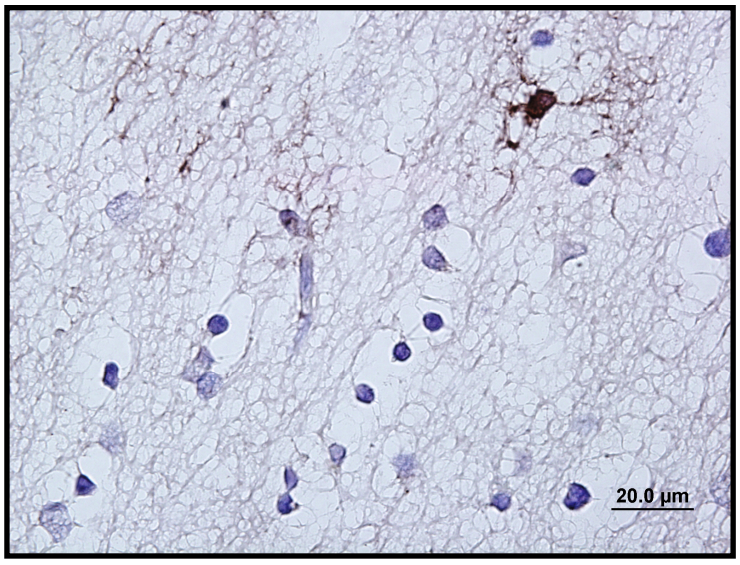
Resim 2: Periventriküler Alan TUNEL reaktivitesi



Grup I (LPS)

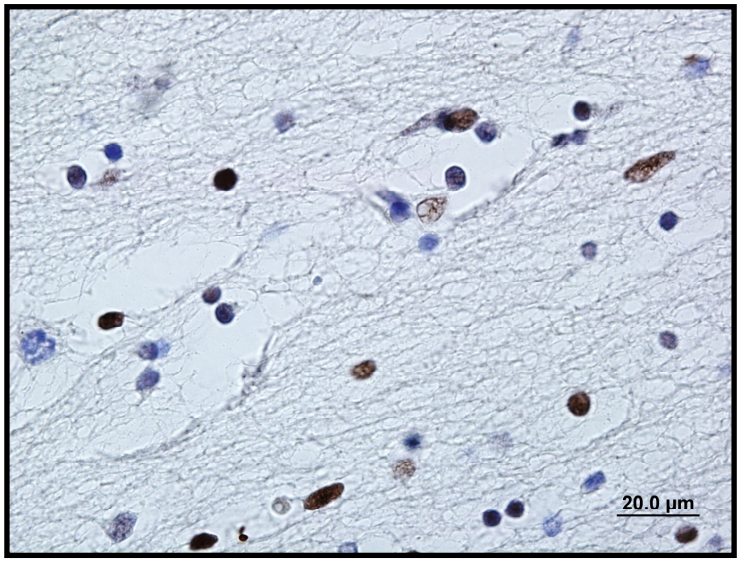


Grup II (LPS+ PTX)

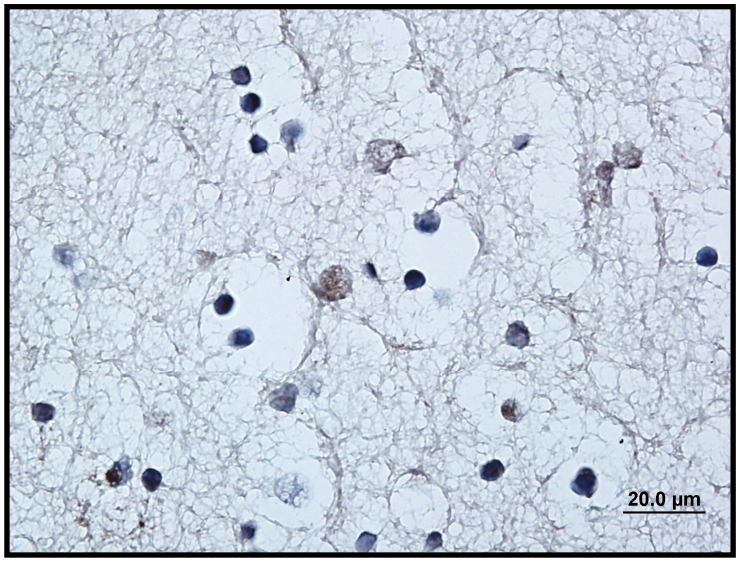


Grup III (Kontrol)

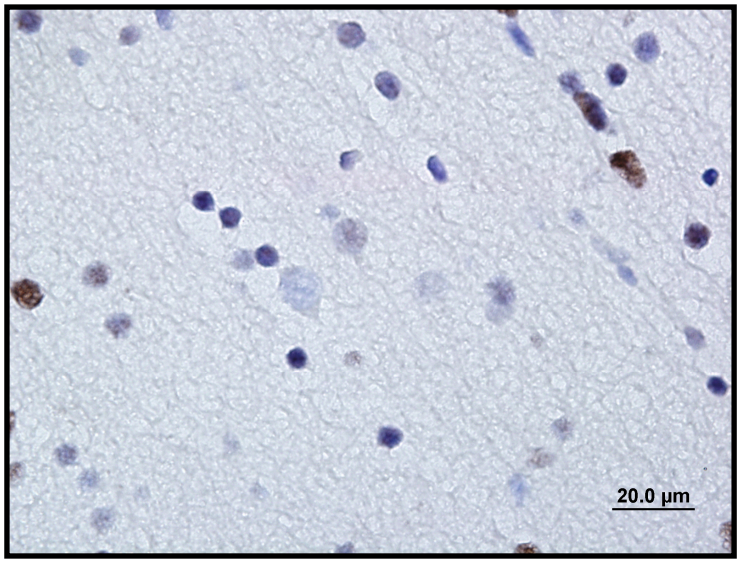
Resim 3: Periventriküler Alan Aktive Kaspaz-3 immunreaktivitesi



Grup I (LPS)



Grup II (LPS+ PTX)



Grup III (Kontrol)

TARTIŞMA

Gelişmekte olan beyindeki iskemik ve inflamatuar etkilenmeler nörolojik hasarla sonuçlanmaktadır. Prematüre bebeklerde ise serebral beyaz cevherdeki immatür oligodendroglialar ve neokorteksin altındaki subplate nöronlar özellikle iskemik ve inflamatuar etkilenmelere duyarlıdır[12]. Hem hasarın engellenmesi hem de hasar sonrası doku tamir mekanizmalarını tetikleyebilecek ya da destekleyebilecek yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır.

Maternal LPS enjeksiyonu, yenidoğan sıçan beyninde miyelinizasyon ve astrogliozis üzerine önemli etkilere neden olmaktadır[36, 37]. Diffüz PVL'de astrogliozis, mikrogliozis olmakta ve oligodendrositler azalmaktadır. Öncül-OL'in miyelin üreten matür hücrelere farklılaşma sürecinde duraklama ortaya çıkmaktadır. MBP, miyelin kılıfının temel proteinidir. Santral sinir sisteminde miyelin oluşumu ve miyelinin çok katlı sıkı yapısının stabilizasyonu için MBP gereklidir. Miyelinizasyon MBP ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna göre LPS uygulaması ile miyelinizasyonun belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. PTX uygulamasının hipomiyelinizasyona karşı koruyucu etkili olduğu görülmüştür. Preterm dönemde periventriküler alanda damarsal anatomik yapı ve serebrovasküler akımın otoregülasyonu henüz olgunlaşmamıştır. Bu süreçte oluşacak iskemi-reperfüzyon, öncül-OL'lerin olgun OL'ler farklılaşmasında yetersizliklere yol açmaktadır. PVL patogenezi göz önünde bulundurulduğunda, özellikle kritik olan serebral perfüzyonun korunması hayati önem taşımaktadır[7]. PTX endotel hücresinin prostasiklin sentezini indüklemektedir. Eritrosit esnekliğini, fibrinolitik ve doku plazminojen aktivatör aktivitesini arttırırken trombosit adezyonunu inhibe etmektedir. Böylece anti-agregan ve vazodilatatör etki göstermektedir. Bu özellikleriyle endotoksinin neden olduğu doku perfüzyonundaki bozulmayı azaltarak BBC hasarına karşı koruyucu etki sağlayabileceği düşünülmektedir[11].

Gebeliğin 19-20. günleri arasında E. coli LPS'i verilen sıçanların yenidoğan yavrularında beyinde anlamlı IL-6, IL-1 ß, TNF-α ekspresyonu ve striatum düzeyinde Tunel-pozitif hücre (apopitotik hücre) artışı saptanmıştır[40-42]. Çalışmamızda benzer şekilde LPS uygulaması ile apopitozis artışı saptanmıştır. PTX tedavisinin apopitozise karşı koruyucu etkisi gözlenmiştir. Ayrıca bu koruyucu etki beyin/vücut ağırlığı oranlarına yansımıştır. Kaspazlar apopitozis esnasında önemli fonksiyon gösteren sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Apopitozis sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde

gelişmektedir. Bu enzimlerin aktivasyonu farklı yollar ile olabilmektedir. IL-1 gibi proinflamatuar sitokinler hücre yüzeyinde Fas reseptörlerini arttırmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan bu reseptörlere Fas-L ve TNF gibi mediatörlerin bağlanması kaspaz enzim sistemini aktive ederek apopitozisi başlatabilmektedir. PTX hücre içi cAMP düzeyini arttırarak TNF-α gen transkripsiyonunu inhibe etmektedir[9, 79]. Monosit ve makrofajlarda PTX'in yaptığı TNF-α supresyonu hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel mekanizmaları kapsamaktadır[80]. PTX, TNF-α'nın indüklediği nötrofil aktivasyonunu inhibe etmektedir. Farelerde maternal LPS uygulaması ile indüklenen intrauterin gelişme geriliği modelinde, LPS ile hem anne serumunda hem de amniotik sıvıda TNF-α artışı gözlendiği, mortalitenin arttığı, fetal ağırlığın ve boyun kısaldığı ancak bu etkilerin PTX uygulaması ile azaldığı bildirilmiştir[81, 82]. PTX'in TNF-α artışını baskılaması apopitozise karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkinin gözlenmesi için beyin dokusunda TNF-α düzeylerinin değerlendirilmesi gereklidir. Böylece PTX inflamasyonu modüle ederek inflamatuar hasara karşı koruyucu rol oynadığı gösterilebilecektir.

Bir nörotransmitter olan glutamat, nöronal doku çevresinde kritik düzeylere ulaştığında reseptör aracılı olan ve olmayan mekanizmalar ile apopitozisi indüklemektedir. Reseptör aracılı olmadan glutamat, glutatyon eksikliğine ve serbest radikal aracılı hücre ölümüne neden olur. AMPA/kainite tipi glutamat reseptörlerinin aktivasyonu da invitro ve invivo olarak OL ölümüne neden olmaktadır. Erişkin sıçanlarda hipokampusa glutamat enjeksiyonu ile beyin hasarı oluşturulduktan sonra öğrenme ve hafıza fonksiyonları değerlendirilmiştir. Glutamatın hipokampal hücre içi cAMP düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. PTX'in hem hücre içi cAMP düzeyini arttırarak hem de Adenozin A1 reseptör blokasyonu yaparak glutamatın öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki toksik etkisini azalttığı bildirilmiştir[83]. Aminofilin, teofilin ve kafein gibi PTX de bir metilksantin türevidir. Metilksantin türevlerinin adenozin reseptör blokasyonu yaptığı bilinmektedir. Aralıklı hipoksi uygulanan yavru ratlarda aminofilinin nöronal hasarı ve apopitozisi azaltarak nöron koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada uzun dönem nörolojik davranışsal testler üzerine de faydalı olduğu bildirilmiştir[84]. PTX'in BBC hasarına karşı koruyucu etkisi, belki de glutamatın eksitotoksik etkisini azaltarak ve adenozin reseptör blokasyonu yaparak gerçekleşmiştir.

LPS uygulaması ile lipit peroksidasyonunu gösteren "thiobarbituric acid-reactive substance"(TBARS), plasentada, anne ve fetal karaciğer dokusunda artmaktadır. PTX eklenmesi ile anne karaciğer ve plasentadaki TBARS düzey artışının azaldığı ancak fetal

karaciğer düzeyine etki etmediği bildirilmiştir. Glutatyon(GSH) serbest radikal kaynaklı hasara karşı koymada anti-oksidan enzimlere substrat olarak görev yapan bir serbest radikal tutucusudur. LPS uygulaması ile GSH plasenta, anne ve fetal karaciğer dokusunda azalmaktadır. PTX uygulaması karaciğer dokularındaki bu azalmaya etki etmezken ilginç bir şekilde plasentadaki artışı agreve etmiştir[82]. PTX'in nötrofil süperoksit salınımı üzerine düşük dozlarda arttırıcı, yüksek dozlarda azaltıcı olmak üzere her iki yönde etkisi olduğu bildirilmiştir[59]. PTX lipit peroksidasyonunu azaltıcı ve serbest radikaller hasarına karşı koruyucu etkili olması, BBC hasarına karşı olumlu etkilerini bu mekanizmalar ile yapabileceğini düşündürmektedir. Ancak PTX'in fetal beyin dokusundaki TBARS ve GHS düzeylerine etkisi henüz bilinmemektedir.

Tavşanlarda yapılan ısı ile plasental hemodinamikleri değiştirerek oluşturulan IUGR modelinde PTX'in plasental perfüzyona olumlu etkisi gözlenmiştir[85]. IUGR'li bebeklerde PVL sıklığının arttığı bilinmektedir[86]. Klinik olarak hemodinamik değişikliklerin gözlendiği gebelerde PTX tedavisinin preklampsi ve IUGR insidanslarını azalttığı bildirilmiştir[87]. PTX, LPS etkisi ile de bozulan plasental perfüzyonu da düzelterek BBC hasarına karşı koruyucu olabilir.

PTX tedavisinin fare, sıçan ve köpek gibi hayvanlarda akciğer, barsak, karaciğer, böbrek, spinal kord, beyin gibi çeşitli dokularındaki iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir[88]. Yedi günlük sıçan yavrusunda sağ karotid arter ligasyonu ardından hipoksi uygulanarak oluşturulan hipoksik iskemik ensefalopati modelinde hem hipoksi, iskemi öncesinde hem de hipoksi iskemi sonrasında PTX uygulaması ile kortikal hasarın azaldığı, PTX'in nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir[89]. Çalışmamız PTX'in maternal LPS uygulaması ile oluşturulan BBC hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca BBC hasarını önlemek amacıyla PTX ilk kez maternal olarak uygulanmıştır.

Sonuç olarak; Maternal PTX tedavisinin LPS ile oluşturulan BBC hasarında nöronal apopitozise karşı koruyucu ve hipomiyelinisasyonu azaltıcı etki gösterdiği immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bunun serbest radikal hasarını azaltarak mı, TNF-α ve diğer proinflamatuar sitokinlerin artışını baskılayarak mı, doku perfüzyonunu düzelterek mi, yoksa glutamat salınımını ve etkisini bloke ederek mi gerçekleştiği bilinmemektedir. PTX'in etki mekanizmasının aydınlatılması için beyin dokusunda proinflamatuar sitokinlerin, glutamat, GSH, TBARS düzeylerinin çalışıldığı yeni araştırmalara gereksinim olduğu görülmektedir.

Günümüzde PVL sıklığını ve neden olduğu nörolojik morbiditeleri azaltmak için

henüz spesifik bir tedavi yoktur. İmmün yanıtın modüle edilmesi bebeği iskemik veya infeksiyöz kaynaklı inflamatuar zedelenmeden koruyabilir. Riskli gebelerde uygulanacak maternal PTX tedavisi, PVL'nin önlenmesinde yeni bir tedavi seçeneği olabilir. Bu konuda ileri araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Bayless S, Stevenson J. Executive functions in school-age children born very prematurely. Early Hum Dev. Apr 2007;83(4):247-254.
2. Platt MJ, Cans C, Johnson A, Surman G, ve ark. Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. Lancet. Jan 6 2007;369(9555):43-50.
3. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, ve ark. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. Lancet. Mar 8 2008;371(9615):813-820.
4. Kobaly K, Schluchter M, Minich N, Friedman H, ve ark. Outcomes of extremely low birth weight (<1 kg) and extremely low gestational age (<28 weeks) infants with bronchopulmonary dysplasia: effects of practice changes in 2000 to 2003. Pediatrics. Jan 2008;121(1):73-81.
5. Volpe J. Neurobiology of the Newborn,. 5 th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2008.
6. Johnson S, Marlow N. Positive screening results on the modified checklist for autism in toddlers: implications for very preterm populations. J Pediatr. Apr 2009;154(4):478-480.
7. Volpe JJ. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. Semin Pediatr Neurol. Dec 2009;16(4):167-178.
8. Bernard C, Barnier P, Merval R, Esposito B, ve ark. Pentoxifylline selectivity inhibits tumor necrosis factor synthesis in the arterial wall. J Cardiovasc Pharmacol. 1995;25 Suppl 2:S30-33.
9. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, ve ark. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. Surgery. Aug 1991;110(2):192-198.
10. Krause PJ, Maderazo EG, Contrino J, Eisenfeld L, ve ark. Modulation of neonatal neutrophil function by pentoxifylline. Pediatr Res. Feb 1991;29(2):123-127.
11. Lerner MR, Balla AK, Wilson MF, Brackett DJ. Pentoxifylline interferes with potential sources of free radical generation during endotoxemia. Adv Exp Med Biol. 1994;366:450-451.

12. Deng W, Pleasure J, Pleasure D. Progress in periventricular leukomalacia. Arch Neurol. Oct 2008;65(10):1291-1295.
13. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. Pediatr Res. Nov 2001;50(5):553-562.
14. Doğum İstatistikleri, 2009. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni. Vol 2010.
15. Sutton PD, Hamilton BE, Mathews TJ. Recent decline in births in the United States, 2007-2009. NCHS Data Brief. Mar 2011(60):1-8.
16. Ülkemizdeki Yenidoğan Bakım Merkezleri 2009 Mortalite Yüzdeleri. Türk Neonatoloji Derneği Bülteni. 2011(23):51.
17. Mollahaliloğlu S BB, Eryılmaz Z (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü). T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri yıllığı 2010. 2011.
18. Marlow N, Hennessy EM, Bracewell MA, Wolke D. Motor and executive function at 6 years of age after extremely preterm birth. Pediatrics. Oct 2007;120(4):793-804.
19. Wood NS, Costeloe K, Gibson AT, Hennessy EM, ve ark. The EPICure study: associations and antecedents of neurological and developmental disability at 30 months of age following extremely preterm birth. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. Mar 2005;90(2):F134-140.
20. Volpe JJ. Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think. Pediatrics. Jul 2003;112(1 Pt 1):176-180.
21. Volpe JJ. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities. Pediatrics. Jul 2005;116(1):221-225.
22. Miller SP, Cozzio CC, Goldstein RB, Ferriero DM, ve ark. Comparing the diagnosis of white matter injury in premature newborns with serial MR imaging and transfontanel ultrasonography findings. AJNR Am J Neuroradiol. Sep 2003;24(8):1661-1669.
23. Woodward LJ, Anderson PJ, Austin NC, Howard K, ve ark. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. N Engl J Med. Aug 17 2006;355(7):685-694.
24. Ligam P, Haynes RL, Folkerth RD, Liu L, ve ark. Thalamic damage in periventricular leukomalacia: novel pathologic observations relevant to cognitive deficits in survivors of prematurity. Pediatr Res. May 2009;65(5):524-529.

25. Pierson CR, Folkerth RD, Billiards SS, Trachtenberg FL, ve ark. Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. Acta Neuropathol. Dec 2007;114(6):619-631.
26. Nosarti C, Al-Asady MH, Frangou S, Stewart AL, ve ark. Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. Brain. Jul 2002;125(Pt 7):1616-1623.
27. Kesler SR, Ment LR, Vohr B, Pajot SK, ve ark. Volumetric analysis of regional cerebral development in preterm children. Pediatr Neurol. Nov 2004;31(5):318-325.
28. Thompson DK, Wood SJ, Doyle LW, Warfield SK, ve ark. Neonate hippocampal volumes: prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. Ann Neurol. May 2008;63(5):642-651.
29. Nosarti C, Giouroukou E, Healy E, Rifkin L, ve ark. Grey and white matter distribution in very preterm adolescents mediates neurodevelopmental outcome. Brain. Jan 2008;131(Pt 1):205-217.
30. Borch K, Greisen G. Blood flow distribution in the normal human preterm brain. Pediatr Res. Jan 1998;43(1):28-33.
31. Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, ve ark. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. J Neurosci. Aug 15 1998;18(16):6241-6253.
32. Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. J Neurosci. Apr 1993;13(4):1441-1453.
33. Follett PL, Deng W, Dai W, Talos DM, ve ark. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. J Neurosci. May 5 2004;24(18):4412-4420.
34. Kurul SH, Yis U, Kumral A, Tugyan K, ve ark. Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain. Neuropediatrics. Feb 2009;40(1):22-27.
35. Duggan PJ, Maalouf EF, Watts TL, Sullivan MH, ve ark. Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. Lancet. Nov 17 2001;358(9294):1699-1700.
36. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, ve ark. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha),

neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. Am J Obstet Gynecol. Jul 1997;177(1):19-26.

37. Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, ve ark. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. Pediatr Res. Jan 2000;47(1):64-72.
38. Edwards A. Cerebral white matter damage in very preterm infants. Biol Neonate. 2002;82(Ext.Abs.):292-293.
39. Saliba E, Rousset C, Potin J, Cantagrel S, ve ark. Inflammation, cytokines and perinatal brain injury. Biol Neonate. 2002;82(Ext.Abs.):291-292.
40. Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. Biol Neonate. 2001;79(3-4):224-227.
41. Yesilirmak DC, Kumral A, Baskin H, Ergur BU, ve ark. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain. Brain Res. Aug 20 2007;1164:14-23.
42. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, ve ark. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. Neonatology. 2007;92(4):269-278.
43. Thompson PJ, Greenough A, Nicolaides KH. Fetal breathing movements and prostaglandin levels in pregnancies complicated by premature rupture of the membranes. J Perinat Med. 1992;20(3):209-213.
44. Hagberg H, Jacobsson B, Wennerholm U, Eklind S, ve ark. Chorioamnionitis and brain injury. Biol Neonate. 2002;82(Ext.Abs):290-291.
45. Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. Jun 2004;18(3):425-436.
46. De Felice C, Toti P, Laurini RN, Stumpo M, ve ark. Early neonatal brain injury in histologic chorioamnionitis. J Pediatr. Jan 2001;138(1):101-104.
47. Chaiworapongsa T, Romero R, Kim JC, Kim YM, ve ark. Evidence for fetal involvement in the pathologic process of clinical chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol. Jun 2002;186(6):1178-1182.
48. Sfaello I, Baud O, Arzimanoglou A, Gressens P. Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. Neurobiol Dis. Dec 2005;20(3):837-848.
49. Yis U, Kurul SH, Kumral A, Cilaker S, ve ark. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. Brain Dev. Oct 2008;30(9):556-562.

50. Tuzun F, Kumral A, Dilek M, Ozbal S, ve ark. Maternal omega-3 fatty acid supplementation protects against lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. J Matern Fetal Neonatal Med. Sep 6.
51. Kumral A, Cemile Yesilirmak D, Sozmen S, Ugur Ergur B, ve ark. Effect of leptin treatment on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. J Matern Fetal Neonatal Med. Jun 1.
52. Keller M, Yang JL, Griesmaier E, Gorna A, ve ark. Erythropoietin is neuroprotective against NMDA-receptor-mediated excitotoxic brain injury in newborn mice. Neurobiology of Disease. Nov 2006;24(2):357-366.
53. Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, ve ark. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Biol Neonate. 2006;89(3):205-210.
54. Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, ve ark. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate. 2005;87(1):15-18.
55. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Akhisaroglu M, ve ark. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate. 2003;83(3):224-228.
56. Kumral A, Tuzun F, Oner MG, Genc S, ve ark. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. Brain Dev. Sep;33(8):632-643.
57. Yis U, Kurul SH, Kumral A, Tugyan K, ve ark. Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat. Neurosci Lett. Dec 31 2008;448(3):245-249.
58. Genc S, Genc K, Kumral A, Ozkan H. White matter protection by erythropoietin: an emerging matter in the treatment of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Stroke. Nov;41(11):e595; author reply e596.
59. Harris E, Schulzke SM, Patole SK. Pentoxifylline in preterm neonates: a systematic review. Paediatr Drugs. Oct 1 2010;12(5):301-311.
60. Boldt J, Muller M, Heyn S, Welters I, ve ark. Influence of long-term continuous intravenous administration of pentoxifylline on endothelial-related coagulation in critically ill patients. Crit Care Med. Jun 1996;24(6):940-946.
61. Costantini TW, Deree J, Loomis W, Putnam JG, ve ark. Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and ZO-1 in

immunostimulated Caco-2 intestinal monolayers. Life Sci. Jan 2 2009;84(1-2):18-22.

62. Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, Kroll L, ve ark. Pentoxifylline modulates intestinal tight junction signaling after burn injury: effects on myosin light chain kinase. J Trauma. Jan 2009;66(1):17-24; discussion 24-15.
63. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. Drugs. Jul 1987;34(1):50-97.
64. Szymura-Oleksiak J, Bury J, Lauterbach R, PawŁOwski M. Serum Concentrations of Pentoxifylline and its Metabolites in Premature Infants with Sepsis when Administered by Continuous Intravenous Infusion. 1997;3:367-371.
65. Lauterbach R, Pawlik D, Tomaszczyk B, Cholewa B. Pentoxifylline treatment of sepsis of premature infants: preliminary clinical observations. Eur J Pediatr. Sep 1994;153(9):672-674.
66. Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. Crit Care Med. Jun 1996;24(6):1072-1078.
67. Lauterbach R, Szymura-Oleksiak J. Nebulized pentoxifylline in successful treatment of five premature neonates with bronchopulmonary dysplasia. Eur J Pediatr. Jul 1999;158(7):607.
68. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. Brain Res Dev Brain Res. Feb 16 2003;140(2):205-214.
69. Haque K, Mohan P. Pentoxifylline for neonatal sepsis. Cochrane Database Syst Rev. 2003(4):CD004205.
70. Selim K, Huseyin C, Ibrahim KH, Hasan BU, ve ark. Effect of pentoxifylline on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in neonatal sepsis. Med J Malaysia. Aug 2004;59(3):391-394.
71. Demir K, Kumral A, Duman N, Sarioglu S, ve ark. Clarithromycin, montelukast, and pentoxifylline combination treatment ameliorates experimental neonatal hyperoxic lung injury. J Matern Fetal Neonatal Med. Jun 2008;21(6):407-413.
72. Lauterbach R, Szymura-Oleksiak J, Pawlik D, Warchol J, ve ark. Nebulized pentoxifylline for prevention of bronchopulmonary dysplasia in very low birth

weight infants: a pilot clinical study. J Matern Fetal Neonatal Med. Jul 2006;19(7):433-438.

73. Rossouw B KE, Lister P. Abstracts of the 5th World Congress on Pediatric Critical Care, June 24-28, 2007, Geneva, Switzerland, (a) Safety of pentoxifylline in infants with severe necrotising enterocolitis [P6.1.694]. (b) Pentoxifylline as an adjunct therapy in infants with severe necrotizing enterocolitis [P6.1.703]. Pediatr Crit Care Med. 2007;8(3 Suppl).
74. Travadi J, Patole S, Charles A, Dvorak B, ve ark. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. Pediatr Res. Aug 2006;60(2):185-189.
75. Erdener D, Bakirtas F, Alkanat M, Mutaf I, ve ark. Pentoxifylline does not prevent hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis. An experimental study. Biol Neonate. 2004;86(1):29-33.
76. Korhonen K, Kiuru A, Svedstrom E, Kaapa P. Pentoxifylline reduces regional inflammatory and ventilatory disturbances in meconium-exposed piglet lungs. Pediatr Res. Dec 2004;56(6):901-906.
77. Vakili A, Zahedi khorasani M. Post-ischemic treatment of pentoxifylline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. Brain Res. May 4 2007;1144:186-191.
78. Kurtoglu S, Gunes T, Koklu E, Bastug O, ve ark. Influence of maternal nicotine exposure on neonatal rat bone: protective effect of pentoxifylline. Exp Biol Med (Maywood). Mar 2007;232(3):398-405.
79. Zhang C, Li XY, Zhao L, Wang H, ve ark. Lipopolysaccharide (LPS) up-regulates the expression of haem oxygenase-1 in mouse placenta. Placenta. Aug-Sep 2007;28(8-9):951-957.
80. Bernard C, Barnier P, Merval R, Esposito B, ve ark. Pentoxifylline selectivity inhibits tumor necrosis factor synthesis in the arterial wall. J Cardiovasc Pharmacol. 1995;25 Suppl 2:S30-33.
81. Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG. Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. J Reprod Fertil. Nov 1990;90(2):395-402.
82. Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, ve ark. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. Toxicol Lett. May 5 2006;163(1):20-29.

83. Cunha GM, Bezerra PJ, Saldanha MD, Cavalcante MC, ve ark. Pentoxifylline improves learning and memory in glutamate-lesioned rats. Pharmacol Biochem Behav. Aug 2000;66(4):687-694.
84. Kumral A, Yesilirmak DC, Aykan S, Genc S, ve ark. Protective effects of methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. Neonatology.98(2):128-136.
85. Kavraiskaia IA, Nazarova LA. [Changes in hemodynamic parameters and temperature regimen in the system mother-placenta-fetus as affected by various drugs]. Biull Eksp Biol Med. Jan 1993;115(1):21-23.
86. Padilla-Gomes NF, Enriquez G, Acosta-Rojas R, Perapoch J, ve ark. Prevalence of neonatal ultrasound brain lesions in premature infants with and without intrauterine growth restriction. Acta Paediatr. Nov 2007;96(11):1582-1587.
87. Strizhakov AN, Musaev ZM, Timokhina TF. [Impaired maternal and fetal hemodynamics in the pathogenesis of gestosis]. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2001(8):43-48.
88. Banfi C, Sironi L, De Simoni G, Gelosa P, ve ark. Pentoxifylline prevents spontaneous brain ischemia in stroke-prone rats. J Pharmacol Exp Ther. Sep 2004;310(3):890-895.
89. Eun BL, Liu XH, Barks JD. Pentoxifylline attenuates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. Pediatr Res. Jan 2000;47(1):73-78.