

Yenidoğan sepsisinde endojen granülosit-koloni stimüle eden faktör (G-CSF) ile nötrofil cevabı ilişkisi

M. Akif Özdemir¹, M. Adnan Öztürk¹, Tamer Güneş², Duran Arslan³, Hacı Sonu⁴

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Pediyatri Profesörü, ²Pediyatri Yardımcı Doçenti, ³Pediyatri Doçenti, ⁴Pediyatri Uzmanı

SUMMARY: Özdemir MA, Öztürk MA, Güneş T, Arslan D, Sonu H. (Department of Pediatrics, Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri, Turkey). Endogenous granulocyte colony-stimulating factor in neonatal sepsis and relationship with neutrophil count. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004; 47: 237-243.

The aim of this study was to determine plasma levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and the relationship with leukocyte count, neutrophil count, results of cultures and sepsis scores in neonatal sepsis. forty-three newborns with gestational ages between seven hours and 37 days with sepsis were included in the study. The severity of sepsis was reevaluated using Tollner's scoring system. We analyzed complete blood count, peripheral blood film and plasma G-CSF. Blood and cerebrospinal fluid cultures were obtained. Plasma G-CSF levels were determined with double sandwich enzyme immunoassay method at first and 20th days. Endogenous G-CSF levels were increased in patients who had increased sepsis score as well as in patients with neutropenia and leukopenia and who were blood culture positive for gram negative microorganisms. G-CSF levels were also increased in acute phase of infection versus late phase, and in preterm infants who had poor prognosis versus term babies. There was an inverse and linear correlation between neutrophil count and G-CSF levels. This study has shown that bacterial toxins are an important stimulator of G-CSF production possibly by a feed-back mechanism, and premature infants are capable of producing sufficient levels of G-CSF.

Key words: neonatal sepsis, cytokines, neutrophil count.

ÖZET: Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yenidoğan Ünitesi'nde izlenen gebelik yaşları 28-40 hafta arasında değişen 43 hastada yapıldı. Klinik olarak sepsis tanısı almış, %77'si kültür pozitifliği ile kanıtlanmış hasta grubunda gebelik yaş, kan kültüründe üreyen mikroorganizma türü, lökosit sayısı, nötrofil sayısı, sepsis skoru ve prognoz ile birinci ve yedinci günde çalışılan endojen G-CSF düzeyleri arasındaki ilişki belirlenerek yenidoğan sepsisinde gelecekte muhtemel sikotin tedavisine ışık tutulması amaçlandı. Endojen G-CSF düzeyinin, lökosit-nötrofil sayılarının düşüklüğü, sepsis skoru yüksekliği, kültürde gram negatif bakteri üremesi gibi faktörlerce pozitif yönde etkilenerek yükseldiği bulundu. G-CSF düzeyinin enfeksiyonun akut döneminde yükselip düzelmeye döneminde düştüğü ve prognozu kötü olan hastalarda yüksek olarak kaldığı görüldü. Prematüre bebeklerin matür yenidoğanlardan daha yüksek düzeylerde G-CSF yapabildiği ve nötrofil sayısı ile endojen G-CSF düzeyi arasında ters ve lineer korelasyon olduğu görüldü. Bu çalışma ile bakteri endotoksinlerinin önemli bir G-CSF uyarıcısı olduğu G-CSF'nin enfeksiyon esnasında akut faz reaktanı gibi davrandığı, nötropenik bebeklerin yeterli G-CSF yapabildikleri tesbit edildi.

Anahtar kelimeler: Yenidoğan sepsis, sitokinler, nötrofil sayısı.

Yenidoğanlarda mortalite ve morbidite nedenlerinin başında sepsis gelmektedir. Bakteriyel sepsis sıklığı zamanında doğmuş bebeklerde %0.1-1 arasında değişirken bu oran düşük doğum ağırlıklı bebeklerde 50 kat artabilir¹⁻³.

Yenidoğanlarda enfeksiyon riski oluşturan önemli nedenlerden birisi de nötrofillerin niteliksel ve niceliksel eksikliğidir. Sıklıkla yenidoğan sepsisine eşlik eden nötropeni prognozu olumsuz yönde etkiler. Bu yüzden

yenidoğan sepsisinin morbidite ve mortalitesini azaltmak amacıyla granülosit transfüzyonları veya rekombinant sitokin desteği ile nötrofil yapımının uyarılması uygulamaları da vardır⁴⁻⁶.

Granülosit-koloni stimüle eden faktör (G-CSF), nötrofil oluşumu ve fonksiyonunun düzenlenmesinde fizyolojik olarak önemli rol oynar. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda G-CSF'in hematopoetik nötrofil öncül koloni büyümesini düzenlediği, kemik iliği nötrofil depo havuzundan salınımı uyardığı, kemotaksis, oksidatif metabolizma ve fagositozu arttırdığı gösterilmiştir⁷. Yenidoğmuş farelerde oluşturulan beta hemolitik streptokok sepsisinde, antibiyotik ile birlikte insan rekombinan G-CSF (rhG-CSF) kullanımının tek başına antibiyotik kullanımına göre mortaliteyi önemli derecede azalttığı görülmüştür⁸. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yenidoğan sepsisinde rhG-CSF kullanımının nötrofenik olmayan hastalarda bile klinik sonuçları olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir⁹⁻¹². Ayrıca preeklamptik anneden doğan bebeklerde görülen inatçı nötrofeninin tedavisinde de G-CSF kullanımının faydalı olduğu gösterilmiştir¹³.

Yenidoğan dönemindeki belirli nötrofenik durumlarda faydalı olduğu ileri sürülerek kullanılması önerilen G-CSF'nin bebeklerdeki endojen profili ve bunu etkileyen faktörlerle ilgili çok az şey bilinmektedir. Nötrofenik yenidoğanlara rhG-CSF verilmeden önce ve verildikten sonra serum ve idrar G-CSF düzeyleri çalışılmış nötrofenik yenidoğan bebeklerin endojen G-CSF konsantrasyonlarının çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuçta rhG-CSF tedavisinin G-CSF reseptörlerinin doymuş durumda olması durumunda bir fayda sağlamayacağı sonucuna varılmıştır¹⁴.

Bu çalışmada yenidoğan ünitemizde izlediğimiz sepsisli yenidoğan bebeklerin serum G-CSF düzeylerini tanı konulduğu sırada ve bir haftalık tedaviden sonra ölçülerek, bunların eş zamanlı total lökosit nötrofil sayıları, sepsise neden olan mikroorganizma türleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde, modifiye Töllner skorlamasına¹⁵ göre sepsis tanısı almış 23 matür, 20 prematür bebekte yapıldı. Hastaların 17'si kız, 26'sı erkek olup, gebelik yaşları 28-40 hafta, postnatal yaşları yedi saat ile 37 gün arasındaydı.

Hastaların tam kan sayımı, periferik kan yayması ile kan, idrar ve beyin omirilik sıvısı kültürleri alındı. Serum C-reaktif protein (CRP) değerleri çalışıldı. Hastaların ilk sepsis tanısı aldığı gün ve bundan bir hafta sonra (yedinci gün) serum G-CSF düzeyleri çalışıldı. G-CSF düzeyi ölçümünde R&D System firmasının araştırmalarda kullanılmak üzere hazırlanmış olan "Quantikine" marka "Sandwich" tipi ELISA kiti kullanıldı. Kitin maksimum ölçtüğü üst düzey 2500 pg/ml idi. Yenidoğan döneminde ortalama lökosit sayısı 10.000/mm³, ortalama nötrofil sayısı 4000/mm³ olarak verildiği için sepsis kliniğine rağmen sonuçları bu değerlerin altında olanlar nötrofil ve lökosit cevabı iyi olmayanlar, sonuçları bu değerlerin üzerinde olanlar nötrofil ve lökosit cevabı iyi olanlar ve total nötrofil sayısı 1500/mm³'den az olanlar ise nötrofenik olarak kabul edildi¹⁶. Hastalar aşağıdaki şekilde gruplandırılarak sonuçları ona göre değerlendirildi:

- Lökosit sayısı >10.000/mm³ (lökosit cevabı iyi olan) ve ≤10.000/mm³ (lökosit cevabı iyi olmayan),
- Nötrofil sayısı >4000/mm³ ve ≤4000/mm³,
- Sepsis skoru ≥11 ve <11,
- Kan kültüründe gram negatif bakteri üreyenler, gram pozitif bakteri üreyenler ve üreme olmayanlar.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmelerinde; Student t, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis ve Wilcoxon t testleri kullanıldı.

Bulgular

Çalışmaya alınan bebeklerden altısında erken neonatal sepsis, 25 bebekte geç neonatal sepsis ve 12 bebekte de nosokomial enfeksiyon vardı. Onyedili sepsisli hastada, erken membran rüptürü, korioamnionit, peripartum maternal ateş, annede üriner sistem enfeksiyonu gibi risk faktörlerinden birisi vardı.

Başvuru anında veya servisteki izlem sırasında nötrofeni bulunan 13 (%30) hastanın dokuzu prematür, dördü matürdü. Gebelik yaşlarına göre değerlendirildiğinde, nötrofeni 20 prematür bebeğin dokuzunda (%45), 23 matür bebeğin dördünde (%17) bulundu. Sepsis skoru 11 hastada <11, 32 hastada ≥11 idi.

Sepsisli hastalarda birinci gün ortalama G-CSF düzeyleri ortalama 1298 ± 170 pg/ml olarak bulundu. Prematür ve matür hastaların birinci

Tablo I. Gebelik yaşlarına göre birinci gün G-CSF düzeylerinin karşılaştırılması

	G-CSF düzeyleri (pg/ml)		T	p*
	n	Ortanca (dağılım)		
Prematür	20	2500 (39-2500)	2.057	<0.05
Matür	23	390 (39-2500)		

*Student t testi.

gün plazma G-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında prematür bebeklerin G-CSF düzeyleri matür bebeklerin G-CSF düzeylerine göre istatistiksel anlamlı olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$, Tablo I).

Plazma G-CSF düzeyleri, hem matür hem prematür lökopenik hastalarda, lökositözlu olanlardan daha yüksekti. Matür sepsisli grupta fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$, Tablo II).

Nötrofil sayıları esas alınarak birinci gün plazma G-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında; nötrofil cevabı iyi olmayanlarda (nötrofil ≤ 4000) daha yüksek değerler elde edilmekle beraber, aralarındaki fark matür grupta istatistiksel olarak anlamlı idi. Bütün hastalar esas alındığında birinci gün G-CSF düzeyleri nötrofenik olanlarda nötrofenik olmayanlardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$ ve $p < 0.01$, Tablo III).

Sepsis skoru ≥ 11 olan prematürelere daha belirgin olmak üzere birinci gün plazma G-CSF düzeyi sepsis skoru < 11 olanlardan daha yüksek

idi. Fakat aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$, Tablo IV). Yedinci gün alınan plazma örneklerinde sepsis skoru ≥ 11 olan prematüre ve matür septik hastaların plazma G-CSF düzeyleri sepsis skoru < 11 olanlardan yüksek idi. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$, Tablo IV).

Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaya göre hastaların birinci gün plazma G-CSF düzeyleri, gram negatif bakteri üreyen prematürelere en yüksek, gram pozitif bakteri üreyenlerde en düşük değerler bulundu. Bakteri üremeyenlerde orta derecede yüksek düzeyler bulundu. Aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$). Matür bebeklerde mikroorganizma türü ile G-CSF düzeyi arasında fark yoktu ($p > 0.05$, Tablo V).

Tartışma

Yenidoğanlarda sepsis siktir ve prognozu kötüdür. Sepsis sırasında nötrofeni insidansı %6-62 arasında bildirilmektedir¹⁷⁻²³. Hastalarımızda %30 oranında nötrofeni görülmüştür.

rhG-CSF nötrofeninin eşlik ettiği birçok hemopoetik, onkolojik ve immün yetmezlik durumlarında başarıyla kullanılmaktadır^{9,18}. Roberts ve arkadaşları²⁴ tekrarlayan nötrofenik sepsis dönemleri olan ileri derecede prematüre bebeklerde rhG-CSF ile başarılı tedavi sonuçları aldıklarını bildirmişlerdir. Gessler ve arkadaşları²⁵ matür ve prematür sağlıklı yenidoğanlarda serum G-CSF konsantrasyonlarının ilk yedi saat boyunca gebelik yaşla ilişkili olarak zirve

Tablo II. Lökosit sayısına göre birinci ve yedinci gün plazma G-CSF düzeylerinin karşılaştırılması

		Lökosit sayısı (mm ³)	G-CSF düzeyleri (pg/ml)		U	p*
			n	Ortanca (dağılım)		
Prematür	1. gün	≤ 10.000	12	2500 (250-2500)	61.0	>0.05
		> 10.000	8	1380 (39-2500)		
	7. gün	≤ 10.000	8	412.5 (39-2500)	40.0	>0.05
		> 10.000	7	39.0 (39-240)		
Matür	1. gün	≤ 10.000	8	2500 (39-2500)	96.5	<0.05
		> 10.000	15	160 (39-2500)		
	7. gün	≤ 10.000	14	59.5 (39-2500)	64.5	>0.05
		> 10.000	7	39.0 (39-640)		

* Mann-Whitney U testi.

Tablo III. Nötrofil sayısına göre birinci ve yedinci gün plazma G-CSF düzeylerinin karşılaştırılması

		Nötrofil sayısı (mm ³)	G-CSF düzeyleri (pg/ml)		U	p*
			n	Ortanca (dağılım)		
Prematür	1. gün	≤4.000	12	2500 (250-2500)	61.0	>0.05
		>4.000	8	1380 (39-2500)		
	7. gün	≤4.000	6	412.5 (39-2500)		
		>4.000	9	39.0 (39-760)		
Matür	1. gün	≤4.000	6	2500 (640-2500)	87.0	<0.05
		>4.000	16	165 (39-2500)		
	7. gün	≤4.000	11	80.0 (39-2500)		
		>4.000	11	39.0 (39-640)		
Prematür+matür	1. gün	>1.500	13	2500 (280-2500)	270.5	<0.01
		≤1.500	30	385 (39-2500)		

* Mann-Whitney U testi.

Tablo IV. Sepsis skorlarına göre birinci ve yedinci gün plazma G-CSF düzeylerinin karşılaştırılması

		Sepsis skoru	G-CSF düzeyleri (pg/ml)		U	p*
			n	Ortanca (dağılım)		
Prematür	1. gün	<11	5	525 (39-2500)	56.0	>0.05
		≥11	15	2500 (48-760)		
	7. gün	<11	12	39 (39-760)		
		≥11	3	1320 (640-2500)		
Matür	1. gün	<11	6	405 (39-2500)	58.0	>0.05
		≥11	17	610 (39-2500)		
	7. gün	<11	19	39 (39-2500)		
		≥11	3	620 (160-2500)		

* Mann-Whitney U testi.

düzelelerine yükseldiğini göstermişler; sepsisli yenidoğanlarda serum G-CSF düzeylerini 1312 ± 396 pg/ml bulmuşlardır. Çalışmamızda da sepsisli yenidoğanlarda ortalama G-CSF düzeyi 1298 ± 170 pg/ml olarak Gessler ve arkadaşlarının²⁵ sonuçlarına çok yakın sonuçlar bulunmuştur.

Çalışmamızda prematür ve matür hastaların tanısında birinci günü G-CSF düzeyleri ile nötrofil sayıları arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmekle birlikte, lökosit sayısı ile G-CSF düzeyi arasında korelasyon yoktu. Birinci

gün nötrofil ve lökosit sayısı düşük olanlarda nötrofil ve lökosit cevabı iyi olanlara göre yüksek G-CSF düzeyleri bulundu. G-CSF yüksekliği düşük lökosit cevabı olan matür hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi. Tüm yenidoğanlar gebelik yaşına bakılmaksızın birlikte değerlendirildiğinde nötrofenik hastalarda nötrofil cevabı iyi olanlara göre ilk gün G-CSF düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. Yedinci gün nötrofeni ve lökopenisi olan hastalarda yüksek G-CSF düzeyleri görülmekle birlikte, lökosit ve nötrofil cevabı

Tablo V. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalara göre birinci gün plazma G-CSF düzeylerinin karşılaştırılması

	Mikroorganizma	G-CSF düzeyleri (pg/ml)		KW	p*
		n	Ortanca (dağılım)		
Prematür	Gram pozitif	3	48 (39-525)	6.128	<0.05
	Gram negatif	12	2500 (160-2500)		
Matür	Gram pozitif	5	610 (39-2500)	0.174	>0.05 U**
	Gram negatif	13	390 (39-2500)		
Matür	Gram pozitif	8	307 (39-2500)	141.0	0.08
	Gram negatif	25	2500 (39-2500)		

* Kruskal-Wallis testi, ** Mann-Whitney U testi.

iyi olan grup ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo II ve III). Nötrofil ve G-CSF arasındaki bu ilişki, nötropeniye cevap olarak G-CSF'nin arttığını düşündürmektedir. Watari ve arkadaşları²⁶ kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu sonrası gelişen nötropeni durumlarında, Cebon ve arkadaşları²⁷ febril nötropenik hastalarda çalışmamızda olduğu gibi yüksek G-CSF düzeyleri bulmuşlardır. Bizim bulgularımız ile paralellik arzeden bu durumun açıklaması Calhaun ve arkadaşlarının¹⁴ çalışma sonuçlarındaki spekülasyonları doğrular niteliktedir. Bu grubun değerlendirmesine göre; G-CSF'in serumdan temizlenmesi spesifik G-CSF reseptörlerine bağlanıp onları satüre etmesiyle mümkün olmaktadır¹⁴. Burada nötropeniye rağmen G-CSF yüksekliği reseptörlerin doygun olmalarıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada sepsis skoru yüksek olan prematür ve matür hastalarda yüksek G-CSF düzeyleri bulundu. Yüksek sepsis skorlu hastaların G-CSF düzeyleri düşük skorlularınki ile karşılaştırıldığında birinci gün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, yedinci gün değerlerinde sepsis skoru yüksek olanlarda G-CSF düzeyleri yüksekti (Tablo IV). Bu da enfeksiyonun kontrol altına alınmadığı durumlarda endojen sitokin düzeyinin yüksek kaldığını gösteren önceki çalışmalara benzerlik göstermektedir^{27,28}.

Bakteriyel toksinler sitokin üretimi için potent uyarıcılardır. Lipopolisakkarit ve endotoksinlerin G-CSF ile IL-6 üretimini uyardığı in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir^{27,29}. Çalışmamızda matür yenidoğanlarda, kan

kültüründe üreyen bakteri türüne göre, G-CSF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ancak kan kültüründe gram negatif bakteri izole edilen prematüre ve matür yenidoğanları içeren tüm hasta grubunda plazma G-CSF düzeylerinin gram pozitif bakteri izole edilenlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın olarak yüksek bulunması (p=0.08, Tablo V) bakteri endotoksinlerinin G-CSF yapımını uyardığını bildiren çalışmalarla^{14,29,30} uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte endotoksinlerin G-CSF'in reseptörleri doyduktan sonraki etkisinin endotoksinler tarafından engellenmesinin mümkün olduğu yorumu da yapılabilir.

Çalışmamızda G-CSF ile nötrofil sayısı arasında ters korelasyon olduğunu gösterdik. Sepsis ve/veya nötropeni sırasında G-CSF ve nötrofil sayısı arasında ters korelasyon, bakteri toksinlerinin bir taraftan kemik iliği süpresyonu yaparak nötropeniye neden olduğunu, diğer taraftan doğrudan etki ile G-CSF üretiminin arttırması ve nötropeniye cevap olarak feedback mekanizma ile G-CSF yapımının artması şeklinde açıklanabilir. Nötrofil sayısının yükselmesi ile G-CSF düzeyinin düşmesi ise toksinlerin vücuttan uzaklaşması ve/veya nötrofilinin G-CSF'nin vücuttan atılımını arttırması şeklinde açıklanabilir^{14,26,31}. Sepsis ve nötropenin birarada olduğu bazı hastalarda yüksek endojen G-CSF düzeylerinin nötropeniye düzeltmemesi inefektif G-CSF yapımı; G-CSF reseptör uyarılma eşiğinin artması veya duyarsızlığı, artmış G-CSF ihtiyacına karşın yetersiz G-CSF yapımı gibi ihtimallere bağlı olabileceği düşünülebilir. Cairo ve arkadaşları³²

kord kanı efektör hücrelerinin G-CSF reseptör sayısı ve affinitesinin erişkinlerden farklı olmadığını bildirdikleri çalışma da göz önüne alınırsa sepsisli hastalarda inefektif G-CSF yapımı ve/veya artmış G-CSF ihtiyacı, yetersiz cevap ihtimalleri üzerinde durulması daha akla yatkın olabilir. Deneysel çalışmalarda, yenidoğan mononükleer hücrelerinden G-CSF yapımının az olduğunun gösterilmesi^{32,33}, Cebon ve arkadaşlarının²⁷ nötropenik erişkinlerde belirledikleri G-CSF düzeylerinin çalışmamızdaki G-CSF düzeylerinden daha yüksek olması, Gillan ve arkadaşlarının¹⁸ sepsis şüpheli yenidoğanlarda rhG-CSF tedavisi ile iyi sonuçlar alması ve etkili serum G-CSF düzeylerini çalışmamızdaki G-CSF düzeylerinin çok üstünde bulmaları, nötropeninin eşlik ettiği yenidoğan sepsisinde inefektif ya da artmış ihtiyaca karşın yetersiz G-CSF yapımı olduğunu düşündürmektedir.

Her ne kadar çalışmamızda, septik ve nötrofil cevabı iyi olmayan yenidoğanlarda yüksek G-CSF bulunduysa da, bu hastalarda rhG-CSF desteği yapılmayacağını savunmak doğru olmayacaktır. Çünkü septik hastalarda endojen G-CSF'nin etkinliği tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca bu sitokinin dışarıdan desteklenmesi ile septik hastalarda iyi sonuçlar alınmış klinik çalışmaların olması inefektif G-CSF yapımı olasılığını kuvvetlendirmektedir.

Sonuçta; septik ve nötropenik hastaların endojen G-CSF'nin nötrofil sayısı ve/veya fonksiyonları üzerine olan etkilerini belirleyen kapsamlı ve çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapıldıktan sonra rhG-CSF desteği yapılıp yapılmamasına karar verilmesinin doğru olacağı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Siegel JD, McCracken GH. Sepsis neonatorum. *N Engl J Med* 1981; 304: 642-647.
2. Öztürk MA. Enfeksiyon hastalıkları. Yurdakök M, Erdem G (ed). *Neonatoloji*. Ankara: 2004, 354-383.
3. Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS, Klein JO (eds). *Infectious disease of the fetus and newborn infant* (3rd ed). Philadelphia: WB Saunders, 1990 601-656.
4. Shiffer CA. Granulocyte transfusion therapy. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 3-7.
5. Dale DC, Liles WC. Return of granulocyte transfusion. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12: 18-22.
6. Calhoun DA, Christensen RD. Recent advances in the pathogenesis and treatment of nonimmune neutropenias in the neonate. *Curr Opin Hematol* 1998; 5: 37-41.
7. Cairo MS, Plunkett JM, Mauss D, Van de ven C. Seven day administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor to newborn rats: modulation of neonatal neutrophilia, myelopoiesis, and group B streptococcal sepsis. *Blood* 1990; 76: 1788-1794.
8. Cairo MS, Mauss D, Kommareddy S, Norris K, Van de ven C, Madanlou H. Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of group B streptococcal sepsis in neonatal rats. *Pediatr Res* 1990; 27: 612-616.
9. Roberts RL, Szalc CM, Scates SM, et al. Neutropenia in an extremely premature infant treated with recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *AJDC* 1991; 145: 808-812.
10. Murray JC, Mc Clain KL, Wearden ML. Using granulocyte colony-stimulating factor for neutropenia during neonatal sepsis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 764-766.
11. Schibler KR, Le TV, Leung L. G-CSF administration to neonates with early onset sepsis and neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Res* 1996; 39: 291A.
12. Le Gamma EF, Alpan O, Kocherlakota P. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on preeclampsia-associated neonatal neutropenia. *J Pediatr* 1995; 126: 457-459.
13. Kocherlakato P, La Gamma E. Human granulocyte colony-stimulating factor may improve outcome attributable to neonatal sepsis complicated by neutropenia. *Pediatrics* 1997; 100: e6
14. Calhaun D, Lunoe M, Du Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor serum and urine concentration in neutropenic neonates before and after intravenous administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatrics* 2000; 105: 392-397.
15. Oygür N, Öztürk E, Yeğin O, Ertuğ H, Bircan İ, Güven AG. Yenidoğan sepsisinin modifiye Töllner metodu ile değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1991; 34: 193-204.
16. Appendix 1. Hematologic reference values. In: Landzkowsky P (eds). *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. New York: Churchill Livingstone, New York: 1995: 629-650.
17. Cairo MS. Cytokines: a new immunotherapy. *Clin Perinatol* 1991; 18: 343-359.
18. Gillan ER, Christensen RD, Suen Y, Ellis R, van de Ven C, Cairo MS, et al. A randomized placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. *Blood* 1994; 84: 1427-1433.
19. Zipursky A, Palko J, Milner R, Akenzua GI. The hematology of bacterial infections in premature infants. *Pediatrics* 1976; 57: 839-853.

20. Christensen RD, Rodhstein G. Pre and post-natal development of granulocyte stem cells. (CFUc) in the rat. *Pediatr Res* 1984; 18: 599-605.
21. Cairo MS, Rucker R, Bennets GA, et al. Improved survival of newborns receiving leukocyte transfusion for sepsis. *Pediatrics* 1984; 74: 887-892.
22. Wheeler JG, Chauvenet AR, Johnson CA, Block SM, Dillard R, Abramson JS. Buffy coat transfusions in neonates with sepsis and neutrophil storage pool depletion. *Pediatrics* 1987; 79: 422-425.
23. Manroe BL, Rosenfeld CR, Weinberg AG, Browne R. The differential leukocyte count in the assessment and outcome of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *J Pediatr* 1977; 91: 632-637.
24. Roberts RL, Szec CM, Scates SM, et al. Neutropenia in extremely premature infant treated with recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *AJDC* 1991; 145: 808-812.
25. Gessler P, Kirchmann N, Kientsch R, Haas N, Lasch P, Kachel W. Serum concentrations of granulocyte colony stimulating factor in healthy term and preterm neonates and in those with various diseases including bacterial infections. *Blood* 1993; 82: 3177-3182.
26. Watari K, Asano S, Shirafuji N, et al. Serum granulocyte colony stimulating factor levels in healthy volunteer patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 1989; 73: 117-122.
27. Cebon J, Layton JE, Maher D, Morstyn G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Haematol* 1994; 86:265-274.
28. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, et al. Levels of serum granulocyte colony stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990; 76: 1962-1964.
29. Van Deventer SJ, Büller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990; 76: 2520-2526.
30. Quesenberry PJ, Morley A, Stohlman F, et al. Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony stimulating factor. *N Engl J Med* 1972; 286: 227-232.
31. Layton JE, Hockmann H, Sheridan WP, Morstyn G. Evidence for a novel in vivo control mechanism of granulopoiesis: mature cell-related control of a regulatory growth factor. *Blood* 1989; 74: 1303-1307.
32. Cairo M, Suen Y, Knoppel E, et al. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr Res* 1992; 31: 574-578.
33. Schibler KR, Liechty KW, White WL, Christensen RD. Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. *Blood* 1993; 82: 2478-2484.