

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

**HİPEROKSİK AKCİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ YENİDOĞAN
RATLARDA RESVERATROLÜN AKCİĞERDEKİ HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ERSİN GÖZKESER**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ÖZMERT MA ÖZDEMİR**

DENİZLİ - 2013

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

**HİPEROKSİK AKCİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ YENİDOĞAN
RATLARDA RESVERATROLÜN AKCİĞERDEKİ HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ERSİN GÖZKESER**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ÖZMERT MA ÖZDEMİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 13.01.2012 tarih ve 2012TPF005 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2013

Yrd. Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR danışmanlığında Dr. Ersin GÖZKESER tarafından yapılan “Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş yenidoğan ratlarda resveratrolün akciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri ” başlıklı tez çalışması gün 03/01/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Aziz POLAT

ÜYE: Prof. Dr. Hacer ERGİN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 14.1.2013.


Prof. Dr Mustafa KILIÇ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Eğitimimin ve tezimin her aŐamasında katkılarından dolayı tez danıŐmanım Yrd. Doç. Dr. Özmert MA ÖZDEMİR'e, her zaman saygıyla anacağım Anabilim Dalı BaŐkanı hocam Prof. Dr. Aziz POLAT, diğer bölüm hocalarım Prof. Dr. Hacer ERĐİN, Doç. Dr. Dolunay GÜRSES, Doç. Dr. Selçuk YÜKSEL, Doç. Dr. Yasemin IŞık BALCI, Yrd. Doç. Dr. Mine CİNBIŐ, Yrd. Doç. Dr. Mustafa DOĞAN'a ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümü çalıŐanlarına, ayrıca tez ve tıbbi konularda desteğini gördüğüm ADÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY, PAÜ Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ferda BİR, PAÜ Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet ZENCİR, PAÜ Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Habib ATALAY'a, son olarak emek, sabır ve desteklerinden dolayı başta anne ve babam olmak üzere aileme TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET	XII
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
BRONKOPULMONER DİSPLAZİ	3
Tanım	3
Tarihçe	4
Görülme Sıklığı	4
Patofizyoloji	5
Etiyoloji/Risk faktörleri	7
Klinik Bulgular ve Prognoz	9
Korunma	10
Tedavi	14
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ ve ANTiOKSİDANLAR ...	16
Hücre İçi Antioksidanlar	16
Membranda Bulunan Antioksidanlar	17
Hücre Dışı Antioksidanlar	17
RESVERATROL	17
GEREÇ ve YÖNTEM	19

HAYVAN MODELİ ve TEDAVİLER	19
İlacın Uygulanması	20
HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	20
Alveol Yüzey Alanının Semikantitatif Ölçümü	21
Fibrozisin Histolojik Değerlendirmesi	21
İmmunohistokimyasal Düz Kas Aktin (SMA) Boyaması ile Değerlendirme	21
BİYOKİMYASAL ANALİZLER	22
Glutasyon Peroksidaz Ölçümü	22
Nitrik Oksit Ölçümü	22
Glutasyon Redüktaz Ölçümü	23
Süperoksit Dismutaz Ölçümü	23
Diğer Biyokimyasal Analizler	24
İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	24
BULGULAR	25
KİLO ALIMI	25
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	27
Alveol Yüzey Alanının Değerlendirilmesi	27
Fibrozisin Değerlendirilmesi	27
SMA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	28
BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI	32
Proinflamatuvar Sitokin Düzeyleri	32
IL-10 Düzeyleri	34
Antioksidan Enzim Düzeyleri	35
Oksidatif Stres Belirteci Düzeyleri	39
NFκB Düzeyleri	41
TARTIŞMA	43
SONUÇLAR	56
KAYNAKLAR	58

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAP	: Amerikan Pediatri Akademisi
AP-1	: Aktivatör protein-1
BPD	: Bronkopulmoner displazi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: <i>Ethylenediamintetraacetic acid</i>
GSH	: Glutasyon
GSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H&E	: Hematoksilen&Eosin
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL-10	: İnterlökin-10
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
Max	: Maksimum
MDA	: Malondialdehid
MIP1-α	: Makrofaj inhibitör protein 1-alfa
Min	: Minimum
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz-9
MPO	: Myeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nCPAP	: Nazal sürekli pozitif havayolu basıncı
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NIH	: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PDA	: Patent duktus arteriozus
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
PPV	: Pozitif basınçlı ventilasyon

RDS	: Respiratuvar distres sendromu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSV	: Respiratuvar sinsityal virüs
SMA	: Düz kas aktin
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: <i>Statistical package for the social sciences</i>
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Deney düzeneği	20
Şekil 2 Grupların deney sonrası ağırlık dağılımı	26
Şekil 3 Grupların deney öncesi ve deney sonrası ağırlık dağılımı	26
Şekil 4 Çalışma gruplarında alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri	29
Şekil 5 Çalışma gruplarında fibrozisin değerlendirildiği akciğer kesitleri	30
Şekil 6 Çalışma gruplarında SMA ekspresyonunun değerlendirildiği akciğer kesitleri	31
Şekil 7 Grupların IL-1 β düzeylerinin dağılımı	33
Şekil 8 Grupların IL-6 düzeylerinin dağılımı	33
Şekil 9 Grupların TNF- α düzeylerinin dağılımı	34
Şekil 10 Grupların IL-10 düzeylerinin dağılımı	35
Şekil 11 Grupların GSH düzeylerinin dağılımı	37
Şekil 12 Grupların GSH-Rd düzeylerinin dağılımı	37
Şekil 13 Grupların GSH-Px düzeylerinin dağılımı	38
Şekil 14 Grupların SOD düzeylerinin dağılımı	38
Şekil 15 Grupların MDA düzeylerinin dağılımı	40
Şekil 16 Grupların MPO düzeylerinin dağılımı	40
Şekil 17 Grupların NO düzeylerinin dağılımı	41
Şekil 18 Grupların NF κ B düzeylerinin dağılımı	42

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Bronkopulmoner displazi tanımlanmasında kullanılan ölçütler .	3
Tablo 2 Eski ve yeni BPD patolojisindeki değişiklikler	6
Tablo 3 Bronkopulmoner displazide görülen komplikasyonlar	10
Tablo 4 Deney gruplarının deney öncesi ve sonrası ortanca ağırlıkları ve karşılaştırılması	25
Tablo 5 Deney gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması	27
Tablo 6 Deney gruplarının fibrozis skorları ve karşılaştırılması	28
Tablo 7 Deney gruplarının SMA skorları ve karşılaştırılması	28
Tablo 8 Deney gruplarının akciğer dokusu proinflamatuvar sitokin düzeyleri ve karşılaştırılması	32
Tablo 9 Deney gruplarının akciğer dokusu IL-10 düzeyleri ve karşılaştırılması	35
Tablo 10 Deney gruplarının akciğer dokusu antioksidan enzim düzeyleri ve karşılaştırılması	36
Tablo 11 Deney gruplarının akciğer dokusu oksidan stres belirteci düzeyleri ve karşılaştırılması	39
Tablo 12 Deney gruplarının akciğer dokusu NFκB düzeyleri ve karşılaştırılması	42

ÖZET

Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş yenidoğan ratlarda resveratrolün akciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri

Dr. Ersin GÖZKESER

Bronkopulmoner displazi (BPD) prematüre bebeklerde önemli morbidite ve mortalite nedeni olan kronik akciğer hastalığıdır. BPD patogenezinde inflamasyon ve oksidatif hasar önemli rol oynamaktadır. Günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda resveratrolün biyokimyasal ve histopatolojik etkileri araştırıldı. Postnatal üçüncü günde başlayıp 13. güne kadar devam eden deneyde yenidoğan rat yavruları randomize olarak 4 gruba ayrıldı: Grup 1 (oda havası+salin, n=10), Grup 2 (oda havası+resveratrol, n=11), Grup 3 (hiperoksi+salin, n=6) ve Grup 4 (hiperoksi+resveratrol, n=7). Resveratrol 30 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Resveratrolün akciğer dokusunda histopatolojik etkileri; alveol yüzey alanı, fibrozis ve düz kas aktin (SMA) skoru olarak, biyokimyasal etkileri ise interlökin 1-beta (IL-1 β), IL-6, IL-10, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehid (MDA), myeloperoksidaz (MPO), nitrik oksit (NO) ve nükleer faktör kappa B (NF κ B) düzeyleri ile değerlendirildi. Çalışma sonunda, oda havası grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi grubunda alveol yüzey alanı, fibrozis, SMA skoru, IL-10 ve NO düzeylerinde belirgin artış olduğu görüldü (p<0.05). Ayrıca, hiperoksi grubunda resveratrol tedavisinin SMA skoru, TNF- α , MDA ve NO düzeylerini belirgin olarak azalttığı, GSH ve SOD düzeylerini ise belirgin olarak arttırdığı saptandı (p<0.05). Sonuç olarak, hiperoksik akciğer hasarlanmasında NO ve oksidan hasarın etiyopatogenezde önemli rolünün olduğu, resveratrolün ise hem antiinflamatuvar hem de antioksidan etkileriyle hiperoksik akciğer hasarını önlemede etkili olduğu gösterildi.

Anahtar kelimeler: bronkopulmoner displazi, resveratrol, nitrik oksit

SUMMARY

Histopathological and biochemical effects of resveratrol on hyperoxic lung injury in neonatal rats

Dr. Ersin GÖZKESER

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic lung disease that causes significant morbidity and mortality in premature infants. Inflammation and oxidative injury play an important role in the pathogenesis of BPD. At present, there is no proven effective treatment modality for BPD. In our study, histopathological and biochemical effects of resveratrol on hyperoxic lung injury model of BPD in neonatal rats were investigated. The experiment was performed on newborn rat-pups from the 3rd to 13th postnatal days and they were randomly divided into four groups: Group 1 (room-air+saline, n=10), Group 2 (room-air+resveratrol, n=11), Group 3 (hyperoxia+saline, n=6), and Group 4 (hyperoxia+resveratrol, n=7). Resveratrol was administered at a dose of 30 mg/kg/day, intraperitoneally. Histopathologic effects of resveratrol on lung tissue were assessed by alveolar surface area, fibrosis, and smooth muscle actin (SMA) score, and its biochemical effects on lung tissue were assessed by interleukin 1-beta (IL-1 β), IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), nitric oxide (NO) and nuclear factor kappa B (NF κ B) levels. According to the results, median alveolar surface area, fibrosis, SMA score, IL-10, and NO levels were found to be significantly higher in the hyperoxia group compared with the room-air group ($p < 0.05$). In addition, it was found that resveratrol treatment was significantly reduced SMA score, TNF- α , MDA and NO levels and increased GSH and SOD levels in the hyperoxia group ($p < 0.05$). In conclusion, this study showed that NO and oxidative stress play an important role in the etiopathogenesis of hyperoxic lung injury, and that resveratrol is effective on preventing hyperoxic lung injury due to its antiinflammatory and antioxidant effects.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, resveratrol, nitric oxide

GİRİŞ ve AMAÇ

Bronkopulmoner displazi (BPD) preterm bebeklerde görülen, akciğer dokusunda inflamasyon, fibrozis, gelişim bozukluğu ve/veya duraklaması sonucunda ortaya çıkan kronik akciğer hastalığıdır. BPD prematüre bebeklerde ciddi morbiditelere yol açabilmektedir. BPD'li bebeklerin uzun süreli izlemi birçok tıbbi, ailevi, sosyal ve ekonomik faktörlerin karmaşık ilişkisini ve etkileşimini içeren bir süreçtir (1, 2).

Bronkopulmoner displazi gelişimini tümüyle önleyen bir yöntem bulunmamaktadır. Prematüre doğumların engellenmesi, prenatal steroid tedavileri, postnatal dönemde sürfaktan, antiinflamatuvar ajanlar, antioksidan tedaviler ve yeni mekanik ventilasyon stratejileri ile hastalık şiddeti azaltılabilmektedir (3).

Klinik ve deneysel kanıtlar oksijen toksisitesinin BPD patogenezinde önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Oksijen toksisitesinin hücresel temeli net bilinmemektedir. Esas mekanizmanın moleküler oksijenin tek değerli oksijene indirgenmesi ve serbest radikal ara ürünlerin oluşumu olduğu düşünülmektedir. Serbest oksijen radikalleri hücre içi bileşenler ve membran lipidleri ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olan reaksiyonlar zincirini başlatmaktadır. Oksidan strese artış ile beraber protein, karbonhidrat ve lipid oksidasyonunun etkisiyle hücresel yapılarda zedelenme ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Oksidan stresin akciğerdeki patolojik etkileri matriks metalloproteinazları aracılığı ile fibrozis ve klinik sonucu BPD'dir (4).

Yenidoğan akciğer hasarı modellerinde BPD patogenezinde çeşitli inflamatuvar hücre ve aracılardan da rol oynadığı görülmüştür. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 gibi sitokinler ve lökotrien, tromboksan ve kompleman gibi sitokin dışı proinflamatuvar mediatörler BPD gelişimi ile yakından ilişkili bulunmuştur (5).

Bir fitokimyasal olan resveratrolün en önemli fonksiyonel özelliği; serbest radikal süpürücü olması yanında, siklooksijenaz, lipooksijenaz, protein kinaz C gibi birçok enzim için modülatör olmasıdır. Yapılan çalışmalarda güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (6). Deneysel olarak akciğerde fibrozis

oluşturulmuş ratlarda, resveratrolün nötrofil infiltrasyonunu gösteren myeloperoksidaz (MPO) ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeyinde düşüş, önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) düzeyinde ise artış sağladığı saptanmıştır (7). IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu için nükleer faktör kappa B (NF κ B) aktivasyonu gerekmektedir. NF κ B kinazı inhibe eden resveratrolün antiinflamatuvar etkisi bu mekanizma ile açıklanmaktadır (8, 9).

Bronkopulmoner displazi tedavisinde günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır (3). Hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında koruyucu etkileri araştırılan az sayıda ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların etkinliği bazı çalışmalarda biyokimyasal olarak, bazı çalışmalarda histopatolojik düzeyde değerlendirilmiştir. Literatürde hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş yenidoğan ratlarda resveratrolün etkinliğini değerlendiren bir çalışmaya rastlayamadık. Bu amaçla çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş yenidoğan ratlarda güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan resveratrolün koruyucu etkisini, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirdik.

GENEL BİLGİLER

BRONKOPULMONER DİSPLAZİ

Tanım

Bronkopulmoner displazi oksijen ve pozitif basınçlı ventilasyon ile tedavi edilmiş preterm bebeklerde gelişen kronik akciğer hastalığıdır. BPD ilk olarak mekanik ventilatör bağımlı preterm bebeklerde klinik, patolojik ve radyolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır (10).

Günümüzde yaygın kabul gören tanımlama ve sınıflandırma sistemi ise Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından 2001 yılında yayımlanan ölçütlere dayanmaktadır (Tablo 1). Bu tanımlama ve sınıflandırmaya göre kronik akciğer hastalığı terimi, yenidoğan dönemi sonrası akciğer hastalıklarını da kapsadığı için yenidoğanın kronik akciğer hastalığını tanımlamada “BPD” teriminin tercih edilmesi gerektiği ve tanımlamada mutlaka hafif/orta/ağır şeklinde sınıflandırma yapılması gerektiği belirtilmiştir. BPD'nin ortaya çıkış yaşı da etkili olduğu için 32. gebelik haftasının altındaki ve üzerindeki bebeklerin ayrı ayrı ele alınması gerektiği, postkonsepsiyonel 36. haftada oksijen bağımlılığının devam etmesi ve toplam olarak 28 günden fazla oksijen bağımlılığının bulunması gerektiği vurgulanmıştır (11).

Tablo 1. Bronkopulmoner displazi tanımlanmasında kullanılan ölçütler (11)

Gebelik haftası	< 32 hafta	≥ 32 hafta
Değerlendirme zamanı	36. gebelik haftası veya taburculukta *	Postnatal yaş >28 gün ve <56 gün veya taburculuk*
Hafif BPD***	Oda havasında soluma	Oda havasında soluma
Orta BPD***	<%30 oksijen gereksinimi	<%30 oksijen gereksinimi
Ağır BPD***	≥%30 oksijen gereksinimi ve/veya PPV** gereksinimi	≥%30 oksijen gereksinimi ve/veya PPV** gereksinimi

*Hangisi önce olursa, **PPV: Pozitif basınçlı ventilasyon

***Bebekler en az 28 gün süre ile oksijen tedavisi almış olup, süregen solunum sıkıntısı bulguları göstermelidir.

Tarihçe

İlk olarak 1967’de Northway ve arkadaşları tarafından yapılan BPD (Klasik BPD) tanımlamasında 30-37 gebelik haftasında doğmuş bebeklerin respiratuvar distres sendromu (RDS) nedeniyle yüksek basınç ve oksijen stratejileri ile ventile edildikleri, bu seyri takiben BPD geliştiği dikkat çekmektedir (10). Pusey ve arkadaşları 1969 yılında RDS olmayan yenidoğanlarda uzamış mekanik ventilasyon ile ilişkili yaygın intersitisyel fibroplaziyi tanımlayarak, RDS’nin BPD için mutlak prekürsör olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda oksijen kullanımı ve bunun komplikasyonları arasındaki ilişki kanıtlanamamış, barotravmanın esas sorun olduğu ileri sürülmüştür (12).

Neonatolojideki teknolojik gelişmeler, antenatal steroid tedavi uygulamaları, surfaktanın kullanıma girmesi, modern ve daha az travma edici ventilasyon tekniklerinin kullanılması ile BPD’nin ortaya çıkış şekli ve çehresi değişmiştir. Böylece etkilenen bebeklerin daha küçük (24-28 hafta) gebelik haftasında doğduğu, başlangıçta RDS’lerinin hiç olmadığı veya hafif RDS, apne ve/veya zayıf solunum çabası gibi nedenlerle entübe edilerek düşük basınç-oksijen stratejileri ile ventilasyon uygulandığı görülmüştür. Klasik BPD patogenezinde sorumlu tutulan en önemli iki faktöre, yani yüksek basınç ve yüksek konsantrasyonda oksijen ile mekanik ventilasyonla karşılaşmadıkları halde bu bebeklerde gelişen bu tablo “yeni BPD” veya “kronik akciğer hastalığı” olarak isimlendirilmiştir (13).

Görülme Sıklığı

Pozitif basınçlı ventilasyon uygulanan RDS’li bebeklerde gebelik haftası ve doğum ağırlığı azaldıkça BPD insidansı artmaktadır. BPD sıklığı, NIH’ın 1997-2002 yılları arasında doğum ağırlığı 500-1500 gr olan 18.000 bebek üzerinde yaptığı çalışmada %23 olarak tespit edilmiştir (14). Ehrenkranz ve arkadaşları çok merkezli çalışmalarında (15) yeni BPD ölçütlerine göre sıklığı; 500-750 gr %52, 751-1000 gr %34, 1001-1200 gr %15, 1201-1500 gr doğan bebekler için %7 olarak bildirmişlerdir.

Patofizyoloji

Normal Akciğer Gelişimi

Akciğer gelişimi mekanik ve humoral birçok faktörden etkilenmektedir. Mevcut bilgiler ışığında insanlarda akciğer gelişimi beş bölüme ayrılmaktadır (16).

1. Embriyonik Dönem: Konsepsiyon sonrası 26. gün ile yedinci gebelik haftası arasındaki dönemi kapsamaktadır. Primordial önbarsaktan köken alan ventral divertikülüm, proksimal trakeayı oluşturmak için kaudale doğru uzanıp, trakeadan sonra dallanıp ana bronşları oluşturmaktadır. Bu dönemde büyüme faktörlerinin önemli düzenleyici etkileri bulunmaktadır.

2. Psödoglandüler Dönem: Yedi ve 16. gebelik haftası arasındaki dönemi kapsamaktadır. Havayolunun terminal bronşiyolleri oluşturmak üzere gelişimi ve solunum epitel ve kartilaj dokuda farklılaşma, preasiner damarlarda anjiogenik gelişim belirgindir.

3. Kanaliküler Dönem: On altı ve 26. gebelik haftası arasındaki dönemi kapsamaktadır. Solunumsal bronşiyoller oluşmakta, özellikle vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) etkisi ile mezankimal damarlanma artmaktadır. Distal küboid epitelin tip I ve tip II epitel hücrelerine farklılaşması tamamlanmaktadır.

4. Sakküler Dönem: Yirmi altı/yirmi sekiz ve 32/36. gebelik haftası arasındaki dönemi kapsamaktadır. Pulmoner parankimin boyutlarının arttığı bu dönemde, alveoler gelişimin öncüleri olan sekonder yarıklar silindirik sakküllere bölünmekte ve sürfaktan sistemi olgunlaşmaktadır.

5. Alveoler Dönem ve Mikrovasküler Matürasyon: Otuz iki/otuz altıncı gebelik haftası ve iki yaş arasındaki dönemi kapsamaktadır. Sakküler akciğerde mevcut olan primer septanın üzerinde sekonder krestin belirmesiyle alveoller oluşmaktadır. İmmatür alveoler septanın çift kapiller tabakasının tek tabakaya dönüşmesi sonucunda mikrovasküler matürasyon gerçekleşmektedir. Otuz ikinci gebelik haftasında doğum olması durumunda akciğerlerde olgun alveollere rastlanabilirse de, tüm alveollerin olgunlaşması 36. gebelik haftası itibariyle gerçekleşmektedir (16, 17).

Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patolojisi

Bronkopulmoner displazili hastaların otopsilerindeki akciğer patolojik bulguları antenatal ve postnatal dönemde uygulanan yeni tedaviler ile birlikte değişiklik göstermiştir (Tablo 2). Sürfaktan kullanımından önceki dönemlerde BPD'nin klasik patolojik bulguları trakeobronşial ağacın her düzeyinde (bronş, bronşiol, alveol, vasküler yatak) görülmekteydi. Bronş, bronşiol ve alveoler bölgede; inflamasyon, alveoler septa yıkımı, fibroproliferasyon, bronş ve bronşiol etrafında ise mürküler ve submukozal bez hiperplazisi ile mukozal skuamöz metaplazi görülmekteydi. Arteriol sayısında azalma, mürküler hipertrofi ve endotelyal hücre hiperplazisi vasküler yatakta görülen değişikliklerdi (2).

Günümüzde BPD nedeniyle ölen bebeklerde ise fibrozisin daha az olduğu ve havalanmanın tüm akciğer alanlarında daha eşit olarak dağılım gösterdiği bildirilmektedir. Büyük ve küçük havayollarında epitelyal metaplazi, düz kas hipertrofisi ve fibrozis daha az izlenmekte, bunların yerine septasyonda aksama ve akciğer gelişim dönemlerinden sakküler dönemde duraklama, alveoler döneme geçememeye işaret eden az sayıda, ilkel ve büyük boyutta alveoller ön plana çıkmaktadır (11).

Tablo 2. Eski ve yeni BPD patolojisindeki değişiklikler *

Patolojik bulgular	Eski BPD	Yeni BPD
Yer yer atelektatik, yer yer aşırı havalandan alanlar	+	-
Havayolu epiteli hasarlanması	Yoğun	Hafif
Havayolu düz kas hiperplazisi	Yoğun	Değişken
İnterstisyel fibroproliferasyon	Yoğun	Hafif
Vasküler hipertansif lezyonlar	Yoğun	Hafif
Az sayıda alveol	+	+
Alveoler hipoplazi	-	+

*(16)

Akciğer Hasarının Meydana Geliş Şekilleri

BPD'nin etiyolojisi multifaktöriyel olup, akciğer fonksiyonlarında (sürfaktan üretimi, vb), hasarın onarılmasında (elastin birikimi, vb) ve akciğer gelişiminde (alveologenezis) bozulmayı içermektedir (18).

1. İnflamasyon: BPD'li bebeklerin bronkoalveoler sıvı incelemesinde birçok sitokin ve kemokin düzeyinin artmış olduğu görülmüştür. Matriks metalloproteinazları, elastaz, nötrofiller, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), adhezyon molekülleri, NF κ B ve endotelin-1 BPD'li bebeklerin bronkoalveoler sıvı incelemesinde artan kemokin ve sitokinlerden bazılarını oluşturmaktadır (19).

2. Yapısal Bozukluklar: Nötrofillerin salgıladıkları reaktif oksijen türleri (ROS) ve proteazlar akciğer parankiminde hücre hasarına yol açmaktadır (2).

3. Fibroproliferasyon: Akciğer gelişiminin kanaliküler ve sakküler aşamalarında gelişen akciğer hasarı basit alveol yapısı, dismorfik kılcak yapı ve fibroproliferasyon ile sonuçlanmaktadır (20) .

4. Gelişim Bozulması/Gecikmesi: Alveoler gelişimin duraklaması daha az ve daha büyük alveoler yapı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum prematüre akciğerde alveol kaybına ve gaz değişimi için yüzey alanının azalmasına neden olmaktadır (16).

5. Damarsal Gelişim Bozukluğu: Normal akciğer oluşumu için distal epitel ve kapiller ağ gelişiminin birlikte ilerlemesi çok önemlidir. Birçok BPD modelinde damarsal gelişimin bozulduğu, VEGF ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (2).

Etiyoloji/Risk faktörleri

Bronkopulmoner displazi gelişimi karmaşık ve birçok etkene açık bir süreçtir. Bu sürece etki eden etiyolojik ajanlarla ilgili ayrıntılı bilgilerin çoğuna ulaşılmasını sağlayan hayvan deneyleri sonucunda, hastalık daha ilk tanımlandığında risk faktörü olarak vurgulanmış olan prematüre doğum, mekanik ventilasyon tedavileri ve oksijenin ana risk faktörleri olduğu görülmüştür (2).

Prematürite

Akciğerler 23-32. gebelik haftasında, gelişimin sakküler evresi boyunca hasarlara karşı çok daha fazla duyarlıdır (20). Ayrıca prematüre bebeklerde fetal büyüme geriliğinin varlığı BPD için bağımsız risk faktörü olarak görülmektedir (15).

Mekanik Ventilasyon

Barotravma ve volüt travma ile akciğerlerde oluşan aşırı gerilme; endotel hasarına, pulmoner damar direncinde artışa, bu da nötrofillerin pulmoner dolaşımında tutulmasına ve inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasına yol açmakta, böylece inflamatuvar hasar oluşmaktadır (11).

Oksijen

İlk tanımlandığı dönemde bile oksijen toksisitesinin akciğerlerde inflamasyon, fibrozis, amfizem nedeni olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (10). Daha sonra yapılan deneylerde de uzamış oksijen maruziyetinin eski ve yeni BPD'nin klinik ve histopatolojik bulgularına neden olduğu gösterilmiş, oksidatif stresin bu bulguların esas belirleyicisi olduğu öne sürülmüştür (4).

İnfeksiyon

Perinatal dönemde geçirilen infeksiyonlar BPD riskini arttırmaktadır. Koryoamniyonit ile ilişkili olan *ureaplasma urealyticum* başta olmak üzere havayolunun infeksiyöz ajanlarla kolonizasyonu BPD riskini arttırmaktadır (21).

Genetik

Bronkopulmoner displazi etiyolojisinde genetik faktörlerin de rolü olduğu öne sürülmektedir. Otuzuncu gebelik haftası ve öncesinde doğan tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada BPD'li tek yumurta ikizlerinin kardeşinde BPD'ye daha yüksek oranda rastlandığı saptanmıştır (22).

Pulmoner Ödem ve Patent Duktus Arteriozus (PDA)

Akciğerin sıvı dengesindeki anormallikler BPD gelişimine katkıda bulunmaktadır. PDA'nın bu mekanizma ile BPD riskini artırdığı düşünülmektedir.

Benzer şekilde fazla sıvı alımı da PDA insidansını arttırmaktadır. NIH tarafından yapılan retrospektif bir çalışmada yaşamın ilk 10 günü vücut ağırlığında daha az kayıp ve fazla sıvı alımının, BPD gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (13, 23).

Yetersiz Beslenme

Bahsedilen etiyolojik faktörlerin tümü preterm bebeklerde yetersiz beslenme nedeniyle ağırlaşmaktadır. Yetersiz besin alımı akciğerin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Yeterli besin desteği ile alveol sayısında azalmanın önlenebileceği belirtilmektedir (24).

Sürfaktan Eksikliği/Disfonksiyonu

Ventilatör bağımlı prematüre bebeklerin yer aldığı bir çalışmada bebeklerin %75'inin trekeal aspiratında yüzey geriliminin anormal derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada devamlı solunum desteği gereken prematüre bebeklerde geçici sürfaktan disfonksiyonu ve eksikliği saptanmış; bu durumun bebeklerin klinik durumlarını etkileyebildiği sonucuna varılmıştır (25).

Adrenal Yetmezlik

Preterm bebeklerde hipotalamus-hipofiz-adrenal bez aksının immatüritesi inflamatuvar akciğer hasarına yanıtta yetersizliğe neden olmakta ve BPD riskinde artışa yol açmaktadır (26).

Klinik Bulgular ve Prognoz

Mekanik ventilasyon öncesi dönemde RDS'li bebekler ölmekte veya solunum sıkıntısı olmaksızın iyileşmekteydi (11). Günümüzde BPD'li bebeklerin yaklaşık üçte ikisinin doğum ağırlığı 1000 gramdan az ve doğum haftası 28 haftanın altındadır. Bu bebeklerin postnatal dönemde solunum desteği almasının nedeni ağır RDS değil, apne ve yetersiz solunum çabasıdır. Bu dönemde PDA, pnömoni veya sepsis, solunum desteği süresini uzatan ve inflamasyonu arttıran faktörler olarak öne çıkmaktadır (13).

Günümüzde Northway ve arkadaşlarının tanımladığı radyolojik görünüm nadir olarak görülmektedir (10). Bunun yerine akciğer grafisinde atelektazi, havalanma artışı, çizgisel interstisyel opasiteler ve kistik alanlar görülmektedir (27). BPD’de yenidoğan döneminde ve uzun dönemde görülen komplikasyonlar Tablo 3’de gösterilmiştir (1,2).

Tablo 3. Bronkopulmoner displazide görülen komplikasyonlar*

Yenidoğan dönemi	Uzun dönem
Uzamış mekanik ventilasyon ve oksijen desteği	Geç dönemde mortalite
Havayolu reaktivitesi	Kardiyopulmoner fonksiyon bozukluğu
Pulmoner ve sistemik hipertansiyon	Azalmış egzersiz toleransı
Büyüme geriliği	Hastaneye tekrarlayan yatışlar
Uzamış yatış süresi	Büyüme geriliği
Ölüm	Nörogelişimsel gerilik

*(1, 2)

Korunma

Bronkopulmoner displazi tanımlandıktan sonra uygulanan tedaviler genellikle akciğer hasarını azaltmaya ve uygun beslenme ile büyümeyi sağlamaya odaklanmıştır. BPD sıklıkla RDS’nin oluşturduğu erken dönem akciğer hasarı ile başlamaktadır. RDS’nin şiddetini azaltacak veya RDS gelişimini önleyecek (sürfaktan tedavisi gibi) tedavilerin BPD gelişimini de önleyeceği düşünülmektedir. Prematüre sorunlarından özellikle persiste eden PDA’nın önlenmesi ve tedavisi de BPD’yi önleme stratejileri arasında yer almaktadır. Sonuç olarak; direk akciğer ile ilişkili olmayan problemler ve hastalıkların tedavisi (prematüre apnesi gibi) BPD gelişimini engelleyici etkide bulunabilmektedir (28). Yeni BPD kavramında çok düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerin yeri düşünüldüğünde, BPD gelişimini engellemede en uygun yaklaşımın erken doğumun önlenmesi olacağı açıktır (2).

Prematürenin Erken Dönem Sorunlarının Tedavisi

1. Sürfaktan Tedavisi: Sürfaktan tedavisi RDS'li preterm bebeklerin standart tedavisi olmakla birlikte, buna bağlı mortalite ve pnömotoraks insidansında da azalma sağlamaktadır. Fakat mevcut kanıtlar erken sürfaktan tedavi stratejilerinin BPD'yi önlediğini desteklemekte yetersiz kalmaktadır (28).

2. PDA'nın Kapatılması: Kanıtlar PDA'nın önlenmesi veya tedavisinin BPD'yi önlediğini desteklememektedir (28).

3. Prematüre Apnesi Tedavisinde Kafein Kullanılması: Prematüre apnesi tedavisinde kullanılan kafeinin aşırı düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda BPD insidansını azalttığı gösterilmiştir. Kafein verilen yenidoğanlarda pozitif havayolu basınç desteği bir hafta erken kesilmekte ve muhtemelen ventilatör bağımlı akciğer hasarını azaltmaktadır (28, 29).

Antiinflamatuvar Tedaviler

1. Sistemik Kortikosteroidler: Son 25 yılda BPD'nin önlenmesi ve tedavisinde sistemik kortikosteroidi kullanan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların birçoğunda akciğer fonksiyonlarında kısa dönemde iyileşme olduğu gösterilmiştir (28). Fakat hipertansiyon, hiperglisemi, hipertrofik kardiyomyopati, adrenal bezde baskılanma ve büyüme geriliği gibi kısa ve uzun dönem yan etkileri nedeniyle postnatal dönemde kortikosteroid kullanımı ile ilişkili endişeler bulunmaktadır. Bu nedenle yarar ve zararları göz önünde bulundurularak, postnatal dönemde sistemik deksametazon tedavisi konusunda ihtiyatlı olunması gerektiği önerilmektedir (30).

Amerikan Pediatri Akademisi (AAP), klinik çalışma dışında sistemik kortikosteroid kullanımını önermemekle birlikte, kullanımını sırasında tedbirli olunmasına dikkat çekmekte; yüksek BPD riski taşıyan prematüreler için nörogelişimsel bozukluk olmadan, sağkalım sürelerinin artması gerektiği belirtilmektedir (31).

Bronkopulmoner displazi için yüksek risk taşıyan hastalarda postnatal ilk haftadan sonra düşük doz steroid tedavisi uygulanmasını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Doyle ve arkadaşlarının çok merkezli çalışmasında (32) ventilatör

bağımlı preterm bebeklerde, ilk haftadan sonra düşük doz deksametazon tedavisinin daha erken ekstübasyon sağladığı gösterilmiştir. Doz azaltılarak uygulanan tedavi sonucunda (0.15 mg/kg/gün üç gün, 0.10 mg/kg/gün üç gün, 0.05 mg/kg/gün iki gün, 0.02 mg/kg/gün iki gün, toplam 0.89 mg/kg, 10 gün) önemli bir yan etkinin ortaya çıkmadığı belirtilmiştir. Diğer bir tedavi protokolüne göre; şiddetli ve tedaviye dirençli hastalarda, kısa süreli (üç gün) ve düşük doz (<0.25 mg/kg/gün) deksametazon uygulanabileceği belirtilmektedir. Postnatal yedinci günden sonra uygulanması önerilen bu tedavi için; FiO₂>0.60, ortalama havayolu basıncı>12-14 cmH₂O olması ve ailenin kısa ve uzun dönem etkiler konusunda bilgilendirilmesi önerilmektedir (30).

2. İnhal Kortikosteroidler: Erken inhale steroid (postnatal ilk iki hafta içinde) tedavisi verilen ventilatöre bağlı pretermelerin yer aldığı, yedi çalışmayı içeren bir meta-analizde mortalite ve BPD üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (33). Geç dönem inhale steroid (postnatal birinci haftadan sonra) tedavisi verilen ventilatöre bağlı pretermelerin yer aldığı, sekiz çalışmayı içeren başka bir meta-analizde ölüm ve BPD sıklığının azalmadığı belirtilmiştir (34).

3. İnhal Nitrik Oksit (NO): Kanıtlar inhale NO'nun BPD'yi önlemedeki rolünün açık olmadığını göstermektedir (28).

Antioksidan Tedaviler

1. Süperoksit Dismutaz (SOD): Yapılmış randomize kontrollü çalışmalar SOD'un BPD'yi önlediğini desteklememektedir (28).

2. GSH: Kanıtlar GSH ve prekürsörleri (N-asetil-sistein) ile tedavinin BPD'yi önlediğini desteklememektedir (28).

Diğer Tedaviler

1. A Vitamini: Vitamin A özellikle akciğer hasarından sonra epitel hücrelerinin gelişimini ve farklılaşmasını düzenlemede kritik bir role sahiptir. Preterm yenidoğanlarda vitamin A düzeyi düşüktür. Düşük vitamin A düzeyi BPD riskinin artışı ile ilişkilidir (30). Dokuz çalışmayı içeren bir meta-analizde vitamin A desteğinin 1000 gr altı yenidoğanlarda BPD gelişimini önlediği gösterilmiştir (35) .

2. Makrolidler: Prematüre bebeklerde solunum yolunun *ureaplasma* ile kolonizasyonu BPD gelişimi için bir risk faktörü olarak görülse de, *ureaplasma* kolonizasyonunun makrolid ile tedavisi BPD'yi önlememektedir (21, 28).

3. Bronkodilatörler: Beta agonistlerin BPD insidansında azalma sağladığı gösterilememiştir. Ipratropium bromidin de rutin kullanımı önerilmemektedir (28).

Ventilatör Stratejileri

1. Permisif Hiperkapni: Retrospektif çalışmalar incelendiğinde, yüksek pCO₂ düzeylerinin daha düşük BPD insidansı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak permisif hiperkapninin BPD'yi önleme etkisini göstermede yeterli kanıt bulunmamaktadır (28).

2. Yüksek Frekanslı Ventilasyon: Yüksek frekanslı ventilasyonun; aşırı havalanma ve volütravmayı azaltması, alveoler düzeyde basıncın daha düşük seviyelerde olmasını ve daha az oksijen gereksinimi sağlaması nedeniyle akciğer hasarını azalttığı belirtilmektedir. Bu nedenle BPD insidansını düşüreceği öngörülmüştür. Fakat mevcut kanıtlar yüksek frekanslı ventilasyonun BPD'den korunmada rutin kullanımını önermemektedir (28).

3. nCPAP (Nazal Sürekli Pozitif Havayolu Basıncı): Retrospektif çalışmalar incelendiğinde doğumdan hemen sonra mekanik ventilasyon yerine veya mekanik ventilasyondan kısa bir süre önce dikkatle seçilmiş prematürlerde nCPAP'ın uygun kullanımı BPD gelişimini azaltıyor gibi görünmektedir. Fakat bu metodun hangi hasta grubu için seçileceği konusu halen açık değildir (28).

Sıvı ve Beslenme

1. Beslenme Desteği: Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde total parenteral nütrisyon uygulamaları farklılık göstermektedir. Mevcut kanıtlar nutrisyonel stratejiler arasındaki farklılıkların BPD gelişimini etkilemediğini göstermektedir. Bu konuda en akılcı yaklaşımın malnütrisyonun korumak olduğu düşünülmektedir (28).

2. Sıvı Kısıtlaması ve Diüretik Tedavi: Doğumdan sonra meydana gelen hızlı kilo kaybı, ekstraselüler sıvı atılımının azalması ile karşılaştırıldığında BPD sıklığında

azalma sağlamaktadır. Fakat kanıtlar BPD gelişimini engellemek için ekstraselüler sıvının azaltılmasına yönelik diüretik kullanımını desteklememektedir (28).

Nabız Oksimetre ile Hedef Satürasyon

Oksijen satürasyon düzeyi %95'den daha yüksek olan prematüre bebeklerde, daha düşük satürasyon düzeyi olan bebeklere göre BPD riski artmıştır. Doğum ağırlığı 1250 gr veya 29. gebelik haftasından küçük bebekler için SpO₂:%88-92 (monitör alarm limiti:%85-93) arasında tutulması önerilmektedir (36).

Tedavi

Hiperoksinin neden olduğu alveologenezis duraklamasında rol oynayan hücresel ve moleküler değişiklikler, alveolarizasyonun postnatal 4 ile 20. günler arasında tamamlandığı kemirgenler üzerinde yirmi yılı aşkın süredir araştırılmaktadır (37). BPD tedavisinde kullanılan yöntemlerin birçoğu hastalığa bağlı bulguların azaltılmasına yönelik olup, hastalığı tamamen ortadan kaldıramamaktadır. BPD'nin önlenmesinde kullanılan yöntemlerin çoğu tedavide de kullanılmaktadır (38).

Oksijen Tedavisi

Tanısı kesinleşmiş BPD'li hastalarda nabız-oksimetre aralığının %94-97 olması; pulmoner hipertansiyon riskini azaltma, büyüme ve gelişme ve uyku düzenini sağlamada en uygun değerler olarak kabul edilmektedir (38).

Diüretik Tedavi

BPD tanısı almış preterm yenidoğanlarda genellikle kullanılan diüretikler; tiazidler, spironolakton ve furosemiddir. Alveoler ve interstisyel ödemi azaltmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Ağır BPD olgularında uzun dönem kullanılacak ve pulmoner ödemi önleyebilecek en güvenli diüretik kombinasyonunun tiazid diüretikleri ile spironolakton olduğu belirtilmektedir (38).

Steroid Tedavisi

Güçlü antiinflamatuvar etkileri nedeniyle BPD tedavisinde kullanılan sistemik steroidlerin uzun dönemde mortalite üzerine etkisi yok iken, BPD insidansını azaltmada etkisinin sınırlı olduğu belirtilmektedir (38). Geç dönem (\geq postnatal yedinci gün) steroid tedavisi uygulanan 19 randomize kontrollü çalışmanın yer aldığı bir meta-analizde ekstübasyon, BPD ve kısa dönemde mortalite üzerine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu tedavinin kısa dönemde hiperglisemi ve hipertansiyon gibi komplikasyonlarda artışa neden olduğu, fakat gastrointestinal sistem komplikasyonlarında artışa neden olmadığı belirtilmiştir (39).

Sistemik steroid tedavisine göre daha az yan etkisi olması nedeniyle kullanılan inhale steroid tedavisinin, BPD'li olgularda faydalı olabileceği belirtilmektedir. Ventilatör bağımlı preterm bebeklerin yer aldığı yedi çalışmayı içeren bir meta-analizde, inhale steroid tedavisi sepsis riskinde artışa neden olmadan, daha iyi ekstübasyon oranı ile ilişkili bulunmuştur (40).

Sildenafil Tedavisi

Hayvan çalışmalarına göre sildenafil alveoler gelişimi arttırmakta ve pulmoner hipertansiyon gelişimini azaltmaktadır. Fakat yenidoğanlarda BPD'de kullanımı ile ilgili yeterli klinik veri bulunmamaktadır (38).

Mukolitikler

Randomize kontrollü çalışmalar bulunmamakla birlikte, intratrakeal veya nebülize dornase- α kullanımı BPD'li hastalarda görülen mukus tıkaçlarını azaltmada başarılı görünmektedir (2).

Beslenme

BPD'li preterm yenidoğanlarda nutrisyonel defisit mortalite, kısa ve uzun dönemde görülen morbidite üzerine etkileri olduğu; ayrıca bu yenidoğanlarda günlük enerji alımındaki artışın, büyüme, solunum ve nörogelişim için yararlı olacağı düşünülmektedir. Fakat bu konuda kanıt oluşturabilecek kontrollü çalışma bulunmamaktadır (38).

İkincil Hastalıkların Önlenmesi

Amerikan Pediatri Akademisi, kronik akciğer hastalığı olan bebeklere ve çok küçük prematüre bebeklere respiratuvar sinsityal virüse (RSV) karşı geliştirilen insan monoklonal antikorlarının (palizivumab) uygulanmasını önermektedir. RSV aşısı ile hastaneye yatış sayısı ve kalış süresinde azalma sağlandığı bildirilmektedir (41).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ ve ANTIOKSİDANLAR

Serbest radikaller en dış yörüngelerinde çiftleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif moleküllerdir. Normalde serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge bozulduğu zaman antioksidan sistem tarafından inaktive edilemeyen serbest radikaller; lipid, protein, polisakkarit oksidasyonuna ve DNA (deoksiribonükleik asit) hasarına yol açmaktadır (42).

Özellikle prematürelere yüksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kalmaları, enfeksiyonla sık karşılaşmaları ve ayrıca düşük antioksidan savunma mekanizmasına sahip olmaları nedeniyle daha fazla oksidatif strese maruz kalmaktadır (43). BPD patogeneğinde ise serbest oksijen radikal hasarının önemi bilinmektedir (4).

Serbest radikallere karşı vücutta antioksidanlar olarak adlandırılan savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidanlar radikal oluşumunun sonlandırılması, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılması ve oluşan radikallerin detoksifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedir (44) .

Hücre İçi Antioksidanlar

Katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve sitokrom oksidaz hücre içinde yer alan enzimatik antioksidanlardır. Elektron transport zincirinde oksijenin suya indirgenmesine kadar olan ara reaksiyonlarda rol almaktadırlar (44).

Membranda Bulunan Antioksidanlar

E Vitamini

E vitamininin koruyucu etkisi membranlarda bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri üzerinedir. Eksikliğinde antioksidan savunmada yetersizlik görülmekte ve lipid peroksidasyonu daha kolay gelişmektedir (45).

C Vitamini (Askorbik Asit)

Antioksidan olarak esas görevi lipid hidroksiperoksitlerin oluşumunu engellemektir. Lipid peroksidasyonunun en güçlü inhibitörüdür ve süperoksit hidroksil radikali gibi çeşitli oksijen radikallerinin en etkili temizleyicisidir (46).

Hücre Dışı Antioksidanlar

Transferrin, laktoferrin, haptoglobülin, hemopeksin, serüloplazmin, askorbik asit, bilirübin ve albümin bilinen hücre dışı antioksidan maddelerdir. Genellikle etkilerini serbest demir veya bakır iyonlarını bağlayarak göstermektedirler (44).

RESVERATROL

Bir fitokimyasal olan resveratrol, ilk kez 1940 yılında *veratrum grandiflorum*'un köklerinden izole edilmiştir. Resveratrol, bitkilerde infeksiyon, sıcaklık dalgalanmaları, ultraviyole, radyasyon ve ozon gibi çevresel etkilere maruz kalındığında fitoaleksinin (bitki antibiyotiği) olarak sentezlenmektedir. Doğadaki en önemli kaynağı üzüm ve şaraptır (47).

Aromatik grup içeren birçok bileşik rezonans yapıları nedeniyle stabil radikaller oluşturarak antioksidan özellik taşımaktadır. Resveratrol içerdiği iki aromatik grup nedeniyle antioksidan aktiviteye sahip olup, oksidatif stresin yol açtığı hücre hasarını ve hastalıkları önlemekte veya geciktirmektedir (44, 48). Hayvan deneylerinde hücre antioksidanları olan SOD, katalaz, GSH, glutatyon redüktaz (GSH-Rd), GSH-Px, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)

konsantrasyonunu arttırdığı, ksantin oksidazı ve neden olduğu hücre hasarını azalttığı ve DNA hasarını önlediği gösterilmiştir (49).

Resveratrol NFκB ve aktivatör protein-1'i (AP-1) baskılayarak, proinflamatuvar ajanların salınım ve sentezini inhibe etmekte ve inflamatuvar cevabı baskılamaktadır (9). NFκB ve AP-1 hücre transformasyonu ve çoğalması, tümör gelişim düzenlenmesi ve apoptoziste rol almaktadır. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, hücre adhezyon moleküllerinin, büyüme faktörlerinin, bazı akut faz proteinlerinin ve immün reseptörlerin esas düzenleyicisi olarak çok yönlü transkripsiyon görevleri bulunmaktadır. NFκB ve AP-1 bağımsız olarak veya koordineli bir şekilde hareket ederek, inflamasyon ve hücreyel çoğalma gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan bu hedef genlerin belirlenmesini düzenlemektedir (47, 50).

Resveratrol profibrotik bir sitokin olan TGF-β inhibisyonu ile antifibrotik özelliğe de sahiptir. Resveratrolün kardiyak kas fibroblast aktivitesini proliferasyon ve diferansiasyon basamaklarında engelleyerek, kardiyak fibrozis ve kardiyak kas hipertrofisini önlediği rapor edilmiştir (51, 52).

GEREÇ ve YÖNTEM

HAYVAN MODELİ ve TEDAVİLER

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (29.06.2011 tarih, 6 sayılı oturum, No: PAUHDEK 2011/025) alınan bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Gebeliği planlanmış *wistar albino* suşu ratların, kendiliğinden doğan yavru ratları spontan doğumu takiben randomize olarak 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=10): Oda havasında kalan, salin verilen grup.

Grup 2 (n=11): Oda havasında kalan, resveratrol verilen grup.

Grup 3 (n=10): Hiperoksi uygulanarak salin verilen grup.

Grup 4 (n=11): Hiperoksi uygulanarak resveratrol verilen grup olarak belirlendikten sonra annelerinin yanına verildi. Postnatal 3. günde başlayıp 13. güne kadar devam eden deneyde Grup 3 ve Grup 4'teki ratlar, pleksiglastan imal edilen kapalı alanlarda hiperoksiye (oksijen konsantrasyonu: 90 ± 2) maruz bırakıldı (Şekil-1).

Hiperoksik akciğer hasarı modeli için hiperoksinin indüklediği BPD rat modeli kullanıldı (53). Oksijen konsantrasyonu günde iki defa kontrol edildi (anestezik gaz monitörü, Drager, 1996). Nem oranı %60-80 arasında tutuldu ve CO₂ soda-lime ile uzaklaştırıldı. Oda havasında tutulan ratlar ile hiperoksiye maruz bırakılan ratlar deney süresince aynı odada (oda ısısı, 22-25°C) bulunduruldu. Tüm rat yavruları anne sütü ile beslenirken, anne ratlar standart rat yemi ile beslendi.

İlaç uygulaması ve bakım sırasında tüm ratlar her gün tartıldı. Anne ratları oksijen toksisitesinden korumak için hiperoksik ortam ile oda havası arasında günlük yer değişimi yapıldı. Ratlar postnatal 14. günde intraperitoneal pentobarbital sodyum (200 mg/kg) enjeksiyonu ile öldürüldü. Toraks boşluğu torakotomi ile açılarak sol akciğer lobları biyokimyasal analizler için kuru tüpte -80°C'de donduruldu. Sağ akciğer lobları patolojik incelemeler için ayrı ayrı kasetlere konarak doku işleminin ardından parafine gömüldü.



Şekil 1. Deney düzeneği. Solda pleksiglastan imal edilen kapalı alanda hiperoksiye maruz bırakılan deney hayvanları, sağda oda havasında bulunan deney hayvanları görülmektedir.

İlacın Uygulanması

Resveratrol için belirlenen 30 mg/kg/gün intraperitoneal doz, daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlendi (54). Plasebo olarak bir dozda %0,9'luk salin 0,01 ml/kg/gün (resveratrol ile aynı miktarda) intraperitoneal olarak uygulandı. Resveratrol ve %0,9 salin 3-14. günler arasında günde bir kez insülin enjektörü ile uygulandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Postnatal 14. günde torakotomi ile açılan göğüs boşluğundan girilerek çıkarılan sağ akciğer 24 saat %10'luk tamponlanmış formaldehit çözeltisi içinde bekletildi. Rutin takip işlemlerinden sonra parafine gömülen örneklerden histopatolojik inceleme için 5 µm'lik kesitler hazırlandı. Kesitler rutin olarak Hemotoksilen&Eosin (H&E) boyası ve histokimyasal olarak Mason-Trikrom boyası ile boyandı. Tek bir patolog (Doç. Dr. Ferda BİR) tarafından kör bir şekilde ışık mikroskobu ile histopatolojik inceleme yapıldı.

Alveol Yüzey Alanının Semikantitatif Ölçümü

Tüm gruplarda H&E ile boyanan sağ akciğerin, büyük damar ve büyük bronş içeren santral akciğer alanları hariç tutularak, periferik kısımlarından X4'lük büyütme ile rastgele 10 alan değerlendirildi. Yüzey alanı genişliği semikantitatif olarak skorlandı. Alveol yüzey alanında azalma derecesine göre; azalma yok:0, hafif azalma:1, orta derecede azalma:2, belirgin azalma:3 olarak derecelendirildi (55).

Fibrozin Histolojik Değerlendirmesi

Tüm gruplarda H&E ve Mason-Trikrom ile boyanan sağ akciğerin orta ve alt loblarına ait kesitler incelemeye alındı. Büyük damar ve büyük bronş içeren santral akciğer alanları hariç tutularak akciğer periferinde X10'luk büyütme alanında 10 alan değerlendirildi. Her akciğer kesitinde fibrozis yokluğu:0, hafif fibrozis:1, orta derecede fibrozis:2, belirgin fibrozis:3 olarak skorlandı (56).

İmmünohistokimyasal Düz Kas Aktin (SMA) Boyaması ile Değerlendirme

Düz kas aktin ekspresyonu avidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılarak görünür hale getirildi. Sağ akciğer loblarının gömülü dokularından poly-L-lysin kaplı camlar üzerine kesit alındı. Bu kesitler ksilen ile deparafinize edildikten sonra distile suya batırılıp rehidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, hidrojen peroksidazın *phosphate-buffered saline* (PBS) içindeki %0,3'lük çözeltisi kullanılarak engellendi. Düz kas aktinine yönelik primer antikor (önceden sulandırılmış, Ventana Medical Systems Inc, ABD) oda sıcaklığında 30 dakika süresince uygulandı ve PBS içinde yıkandı. Peroksidaz aktivitesi 5 dakika uygulanan %0.03 derişimde 3–3 diaminobenzidin tetrahidroklorid ile görüntülendi Deiyonize suda yıkayıp hematoksilin ile boyanan kesitler dehidrate edilip kapatıldı. Uygun doku kesitleri primer ve sekonder antikor için ayrıca pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlem den geçirildi. İmmünohistokimyasal skorlama için X10'luk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen 10 alan rastgele seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi; yoğunluk ve

dağılım açısından 1'den 4'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak, semikantitatif skorlama ile değerlendirildi (57).

BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Akciğer doku örnekleri proteaz inhibitörü olan 0.2 µM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 mM ethylenediamin tetra acetic acid (EDTA), 1 µM leupeptin içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4, 1/10 g/ml) 4°C'de homojenize edildi. Homojenatlar MPO için örnek ayrıldıktan sonra, 10.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki supernatant eşit olarak ayrılarak diğer parametrelerin bakılabilmesi için -80°C'de donduruldu.

Glutatyon Peroksidaz Ölçümü

Dokuda GSH-Px aktivitesi Kakkar ve ark.'nın (58) yöntemine göre minör modifikasyonla saptandı. GSH-Px reaksiyon karışımı; 75 mmol fosfat tamponu (pH 7.0), 60 mmol GSH, 30 U/ml GSH-Rd, 15 mmol Na₂EDTA içermektedir. Küvet 37°C'ye ayarlanan spektrofotometreye kondu. Küvetin içine reaksiyon karışımı konarak dilüe edilmiş hemolizat eklendi. Reaksiyon H₂O₂ (%30) ile başlatıldı ve NADPH'daki absorbansın azalması 340 nm'de 3 dakika izlendi. Non enzimatik reaksiyon hızı kör çalışılarak hesaplandı. Sonuçlar, mU/g yaş doku olarak verildi.

Nitrik Oksit Ölçümü

Dokuda NO düzeyi Navarro-Gonzalves ve ark.'nın yöntemine (59) göre saptandı. Doku supernatantı önce proteinlerinden ayrıldı. Glisin-NaOH tamponu; glisin ve sodyum hidroksit kullanılarak hazırlandı. Glisin-NaOH tamponu içindeki CuSO₄ çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid (%37) ve sülfanilamid ile hazırlandı. NED çözeltisi [N-(1-naphtyl) ethyl-enediamine dihydrochloride] kullanılarak hazırlandı. Standartlar NaNO₂ (sodyum nitrit) kullanılarak, 2-80 µg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki NO konsantrasyonu Griess reaksiyonu sonucunda ölçüldü. Örnekler ve standartlar, ELISA mikropate okuyucuda 540 nm'de okutuldu. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar $\mu\text{M}/\text{gr}$ yaş doku olarak verildi.

Glutatyon Redüktaz Ölçümü

Dokuda GSH-Rd aktivitesi Racker ve ark.'nın yöntemine (60) göre saptandı. Reaksiyon karışımı; 50 mmol/L tris tamponu (pH:7.6), 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EDTA, 4 mmol/L oksitlenmiş GSH, 120 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NADPH ile hazırlandı. Reaksiyon karışımı küvetlere kondu ve uygun oranda eritrositlerden hazırlanmış hemolizat konarak reaksiyon başlatıldı. 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla GSH-Rd düzeyleri saptandı. Reaksiyon 3 dakika izlendi. Sonuçlar U/gr yaş doku olarak verildi.

Süperoksit Dismutaz Ölçümü

Dokuda SOD ölçümü Sun ve ark.'nın yöntemine (61) göre saptandı. Doku süpernatantı kloroform ve etanol ile iyice çalkalandı. Örnekler içindeki SOD 12.000 g'de 1 saat santrifüjlendikten sonra ekstrakte edildi. SOD deney çözeltisi; 0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L EDTA, 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nitroblue tetrazolium, amonyum sülfat (NH_4SO_4), 167 U/L ksantin oksidaz içermektedir. Bu çalışma çözeltisine örnekler eklendikten sonra 25°C'de su banyosunda ksantin oksidaz çözeltisi eklendi. Reaksiyon Cu_2Cl (bakır klorür) eklenerek durduruldu. Ayrıca kör çözeltisi hazırlandı. Deney sonunda oluşan renk 560 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. SOD standardı (Cu, ZnSOD porcine erythrocytes) ile 0-270 ng/tüp ve % inhibisyon değerleri karşılıklı gelecek şekilde oluşturuldu. Her örnek için elde edilen inhibisyon değeri ve grafik kullanılarak SOD değeri saptandı. SOD düzeyleri ng/gr yaş doku olarak verildi.

Diğer Biyokimyasal Analizler

Akciğer dokusunda IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MDA, MPO, GSH ve NF κ B düzeyleri ticari ELISA kitleri (Bender Medsystems GmbH, Campus Vienna Biocenter, Vienna, Austria) ile saptandı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 10 paket programı kullanıldı. Deney gruplarının; alveol yüzey alanı, fibrozis, imünohistokimyasal skorlar ve akciğer doku biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılmasında nonparametrik analizlerden *Kruskal-Wallis* ve *Mann Whitney-U* testleri kullanıldı. Dört grubun ağırlık açısından değişimi tekrarlayan ölçümlerde *Varyans analizi (Post-Hoc Tukey test)* ile test edildi. Tanımlayıcı istatistik olarak ise ortanca, minimum-maksimum (min-max) değerleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığı yansıtan *p* değeri <0.05 seçildi.

BULGULAR

Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda yer alan dörder ratın deney sırasında ölmesi nedeni ile çalışma 34 rata ait akciğer dokularının incelenmesi ile tamamlandı.

KİLO ALIMI

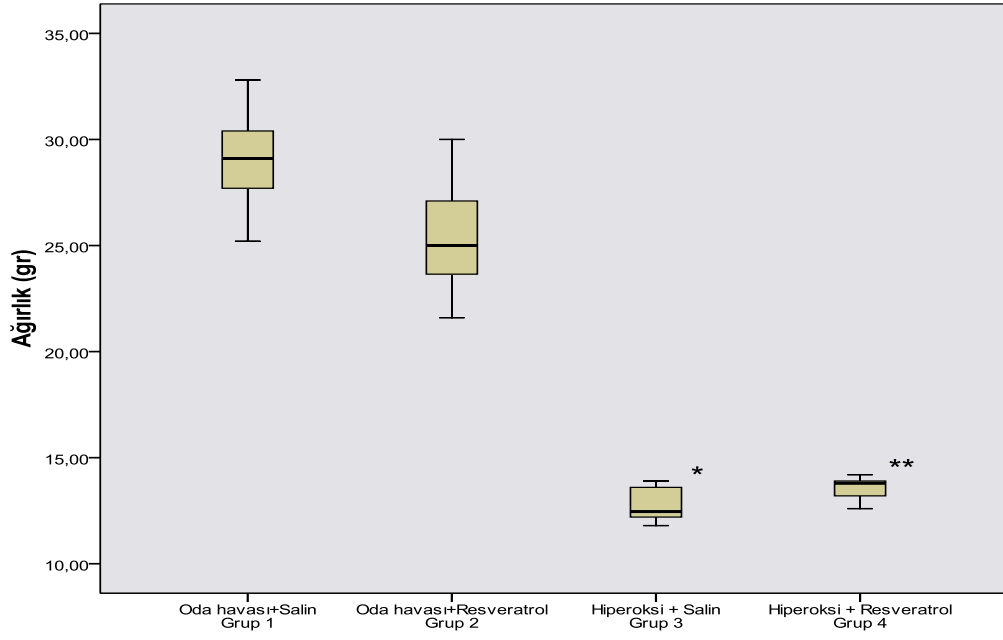
Deney öncesi gruplar arasında ortalanca ağırlık bakımından farklılık yoktu ($p>0.05$). Deney sonunda ise hiperoksiye maruz bırakılan ratların ağırlıkları oda havasında tutulanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4, Şekil 2, Şekil 3).

Tablo 4. Deney gruplarının deney öncesi ve sonrası ortalanca ağırlıkları ve karşılaştırılması

Ağırlık (gr)	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=11)	Grup 3 (n=6)	Grup 4 (n=7)	<i>p</i>
Deney öncesi					
Ortanca (min-max)	10.6 (8.8-13.1)	11.3 (9.9-13.1)	10.4 (9.4-12.4)	10.2 (8.7-12.8)	>0.05
Deney sonrası					
Ortanca (min-max)	29.1 (23.1-32.8)	25.5 (21.6-30.0)	12.4* (11.8-13.9)	13.8** (11.5-14.2)	<0.001

* Grup 3< Grup 1 ve Grup 2 ($p<0.001$).

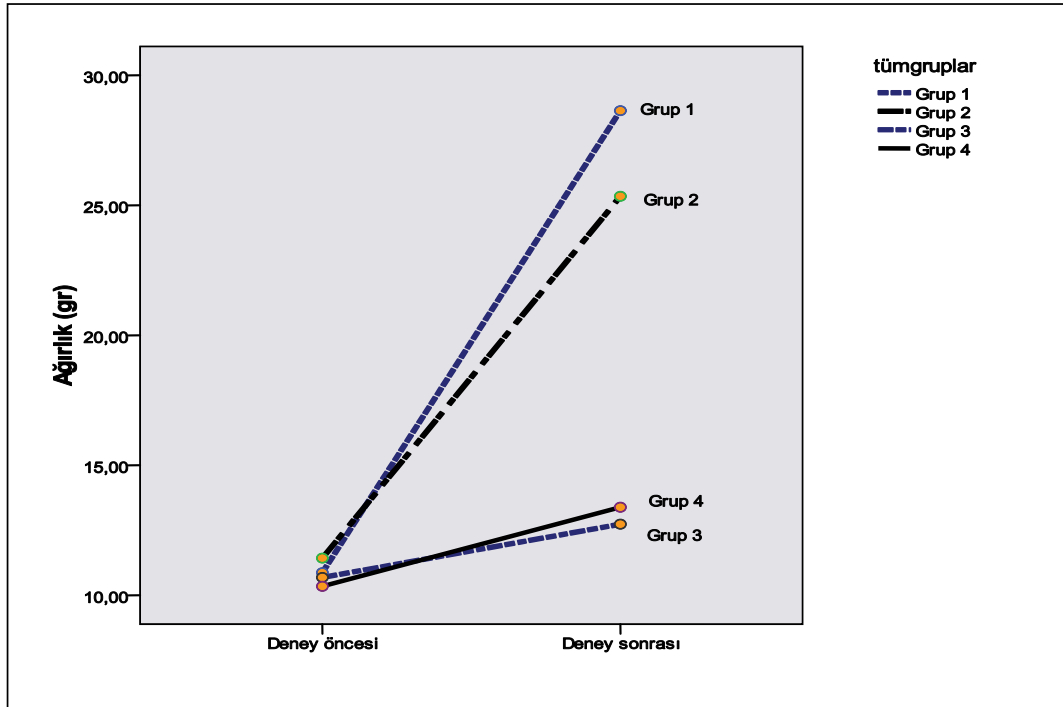
** Grup 4< Grup 1 ve Grup 2 ($p<0.001$).



* Grup 3 < Grup 1 ve Grup 2 ($p < 0.001$).

** Grup 4 < Grup 1 ve Grup 2 ($p < 0.001$).

Şekil 2. Grupların deney sonrası ağırlık dağılımı



Şekil 3. Grupların deney öncesi ve deney sonrası ağırlık dağılımı

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Alveol Yüzey Alanının Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması Tablo 5’de belirtilmiştir. Oda havasında tutulanlara göre, hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda alveol yüzey alanında belirgin azalma saptandı ($p<0.05$). Hiperoksiye maruz bırakılan ve salin verilen ratların (Grup 3) üçte birinde alveol yüzey alanında belirgin azalma saptandı. Hiperoksiye maruz bırakılan ve resveratrol verilen (Grup 4) ratların hiçbirinde alveol yüzey alanında belirgin azalma saptanmadı. Grup 4 ile Grup 3 arasında ise istatistiksel bir farklılık yoktu ($p>0.05$) (Şekil 4).

Tablo 5. Deney gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması

Alveol yüzey alanı	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=11)	Grup 3 (n=6)	Grup 4 (n=7)	<i>p</i>
Değişim yok (Skor:0)	4	4	0	0	
Hafif azalma (Skor:1)	6	7	1	4	
Orta derecede azalma (Skor:2)	0	0	3	3	
Belirgin azalma (Skor:3)	0	0	2	0	
Ortanca (min- max)	1(0-1)	1(0-1)	2(1-3)*	1(1-2)**	< 0.05

* Grup 3> Grup 1 ve Grup 2 ($p<0.05$).

** Grup 4> Grup 1 ve Grup 2 ($p<0.05$).

Fibrozisin Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarının fibrozis skorları ve karşılaştırılması Tablo 6’da belirtilmiştir. Hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda fibrozis skoru oda havasında tutulanlara göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplar fibrozis skoru bakımından değerlendirildiğinde hiperoksi+resveratrol verilen grubun (Grup 4) hiçbirinde belirgin fibrozis yokken, hiperoksi+salin (Grup 3) verilen grubun üçte birinde belirgin fibrozis saptandı. Ancak gruplar arasında istatistiksel farklılık yoktu ($p>0.05$) (Şekil 5).

Tablo 6. Deney gruplarının fibrozis skorları ve karşılaştırılması

Fibrozis	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=11)	Grup 3 (n=6)	Grup 4 (n=7)	p
Yok (Skor:0)	9	9	0	0	
Hafif (Skor:1)	1	2	1	4	
Orta (Skor:2)	0	0	3	3	
Belirgin (Skor:3)	0	0	2	0	
Ortanca (min- max)	0 (0-1)	0 (0-1)	2 (1-3)*	1 (1-2)**	<0.05

* Grup 3> Grup 1 ve Grup 2 (p<0.05).

** Grup 4> Grup 1 ve Grup 2 (p<0.05).

SMA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

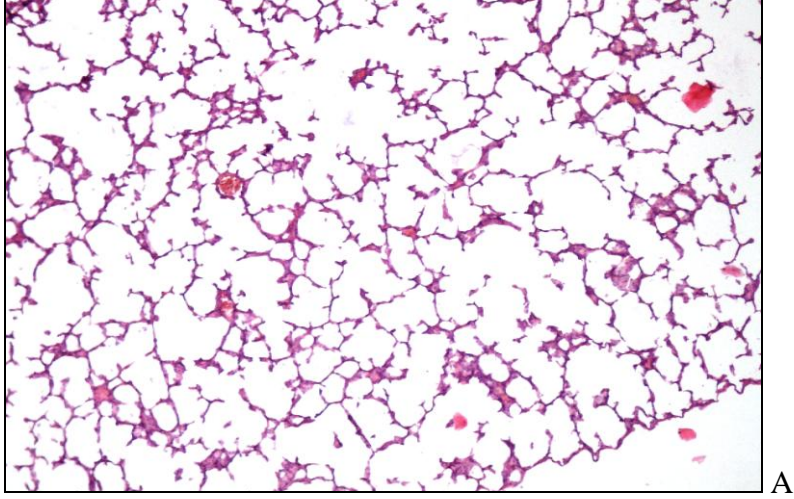
Çalışma gruplarının SMA skorları ve karşılaştırılması Tablo 7’de belirtilmiştir. SMA ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, hiperoksiye maruz kalan gruplarda akciğerde düz kas içeriğinin artmış olduğu görüldü. Hiperoksiye maruz kalan gruplar SMA skoru bakımından değerlendirildiğinde, hiperoksi+resveratrol grubunda (Grup 4) hiperoksi+salin grubuna (Grup 3) göre ortanca SMA skoru daha düşük ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p <0.05) (Şekil 6).

Tablo 7. Deney gruplarının SMA skorları ve karşılaştırılması

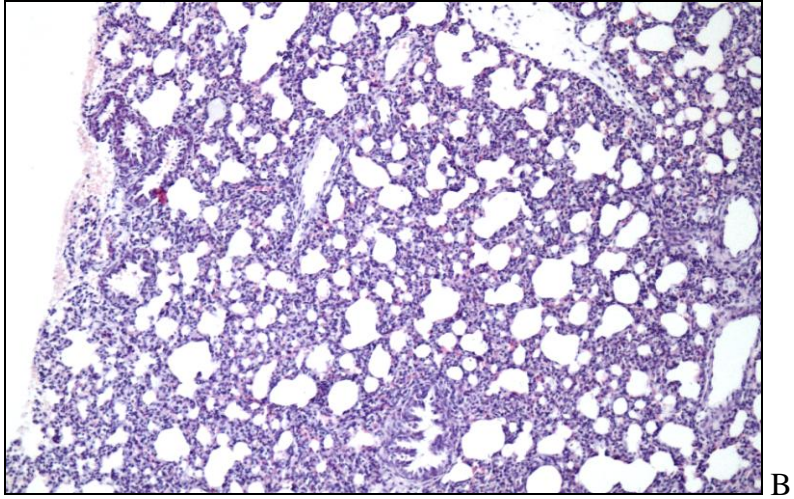
SMA skoru	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=11)	Grup 3 (n=6)	Grup 4 (n=7)	p
Ortanca	1	1	9*	4**	<0.05
(min-max)	(1-2)	(1-2)	(4-16)	(2-9)	

* Grup 3> Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 (p<0.05).

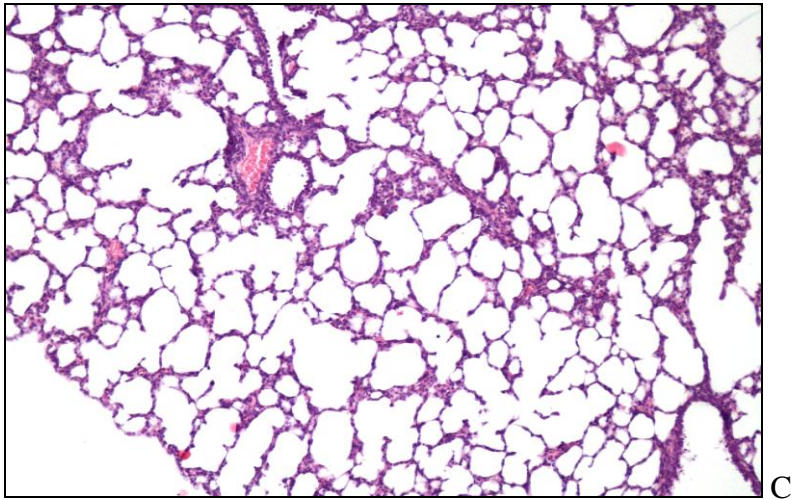
** Grup 4> Grup 1 ve Grup 2 (p<0.05).



A

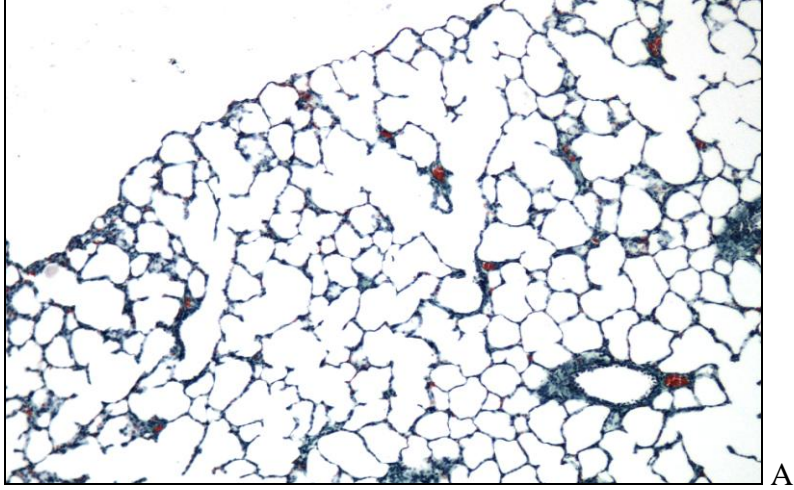


B

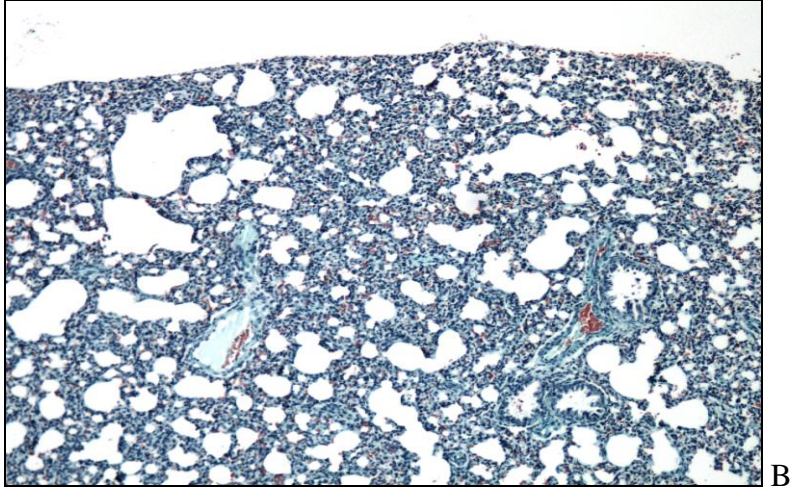


C

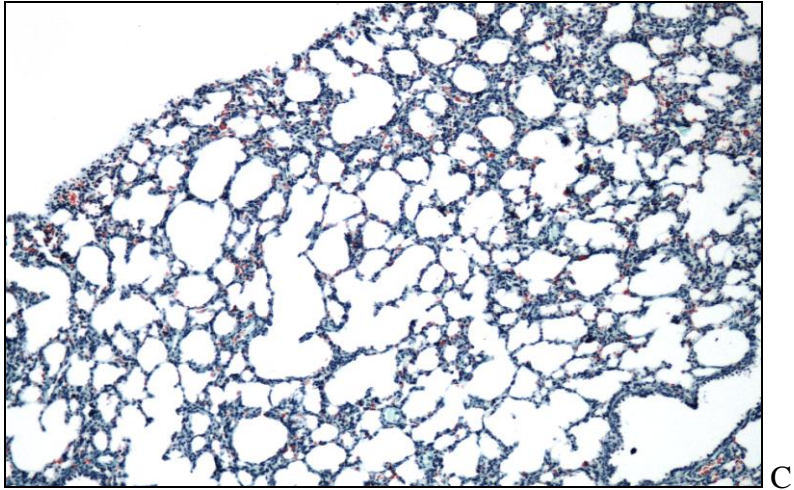
Şekil 4. Çalışma gruplarında alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası+Salin (Grup 1); B) Hiperoksi+Salin (Grup 3); C) Hiperoksi+Resveratrol (Grup 4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında yoğun hücresel infiltrasyon ve alveol yüzey alanda azalma dikkat çekmekte, bu azalma Grup 3’de daha belirgin görülmektedir (X4, H&E boyama).



A

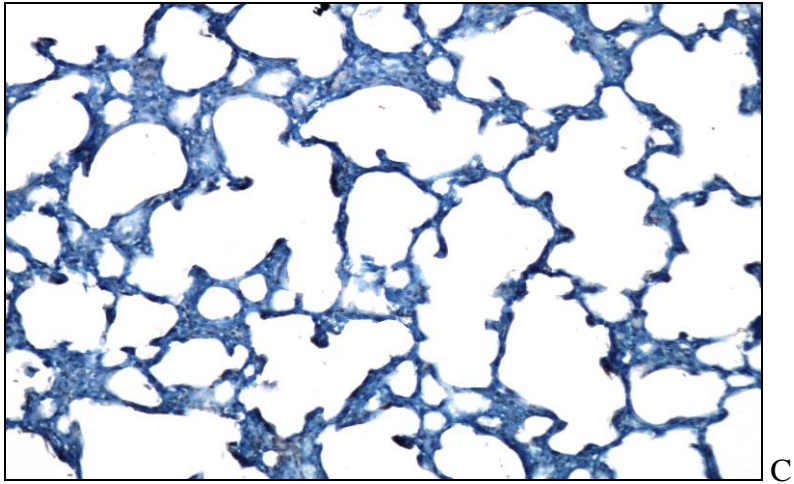
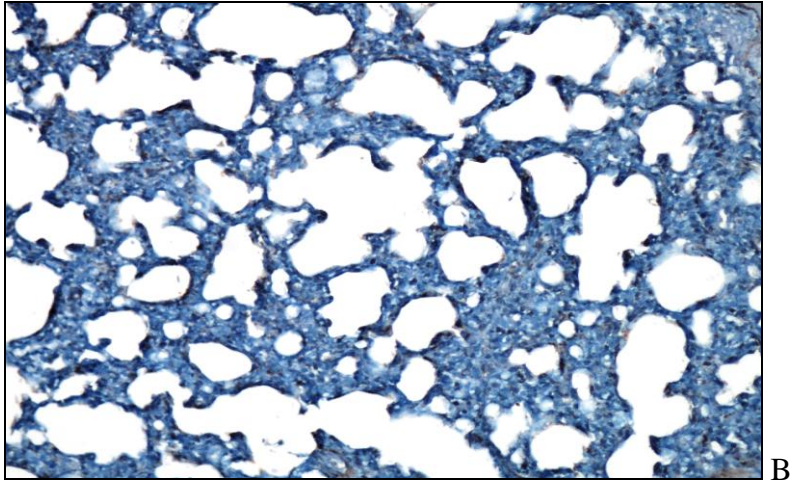
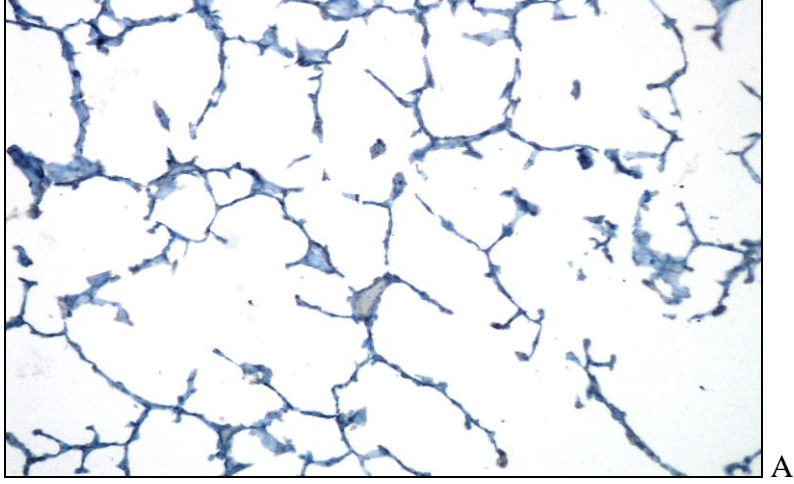


B



C

Şekil 5. Çalışma gruplarında fibrozisin değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası+Salin (Grup 1); B) Hiperoksi+Salin (Grup 3); C) Hiperoksi+Resveratrol (Grup 4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında fibrozis artışının Grup 3’de daha belirgin olduğu görülmektedir (X4, Mason-Trikrom boyama).



Şekil 6. Çalışma gruplarında SMA ekspresyonunun değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası+Salin (Grup 1); B) Hiperoksi+Salin (Grup 3); C) Hiperoksi+Resveratrol (Grup 4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında düz kas içeriği artışının Grup 3’de daha belirgin olduğu görülmektedir (X10, SMA boyama).

BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

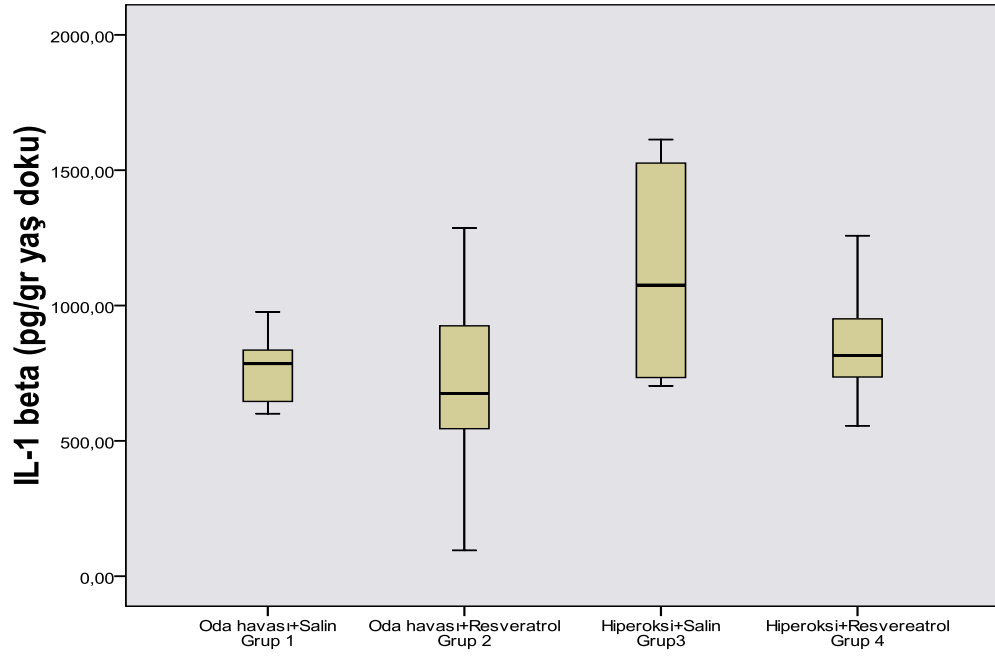
Proinflamatuvar Sitokin Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 8’de belirtilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında IL-1 β ve IL-6 düzeyleri resveratrol verilen gruplarda (Grup 2 ve Grup 4) salin verilen gruplara (Grup 1 ve Grup 3) göre daha düşük bulundu. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$), (Şekil 7, Şekil 8). TNF- α düzeyi bakımından gruplar değerlendirildiğinde, hiperoksiye maruz bırakılan gruplardan resveratrol verilen grupta salin verilen gruba göre TNF- α düzeyi anlamlı şekilde düşük saptandı ($p<0.05$) (Şekil 9).

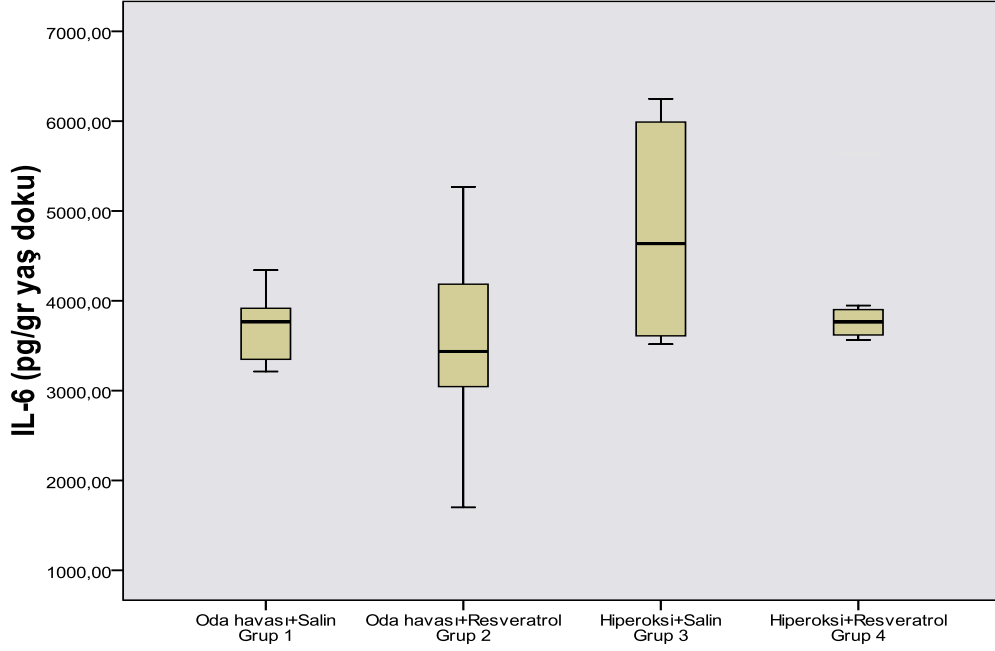
Tablo 8. Deney gruplarının akciğer dokusu proinflamatuvar sitokin düzeyleri ve karşılaştırılması

	Grup 1 (n=10) Ortanca (min-max)	Grup 2 (n=11) Ortanca (min-max)	Grup 3 (n=6) Ortanca (min-max)	Grup 4 (n=7) Ortanca (min-max)	p
IL-1β (pg/gr)	785.22 (600.58-976.50)	675.35 (95.29-1286.11)	1075.21 (703.48-1613.35)	815.37 (556.04-1258.20)	>0.05
IL-6 (pg/gr)	3766.08 (3213.09-4341.68)	3436.78 (1700.09-5269.54)	4636.40 (3517.42-6248.62)	3856.73 (3080.76-5651.90)	>0.05
TNF-α (pg/gr)	443.15 (265.60-508.87)	475.66 (328.11-603.75)	510.49 (407.77-542.83)	408.67 * (312.71-468.79)	<0.05

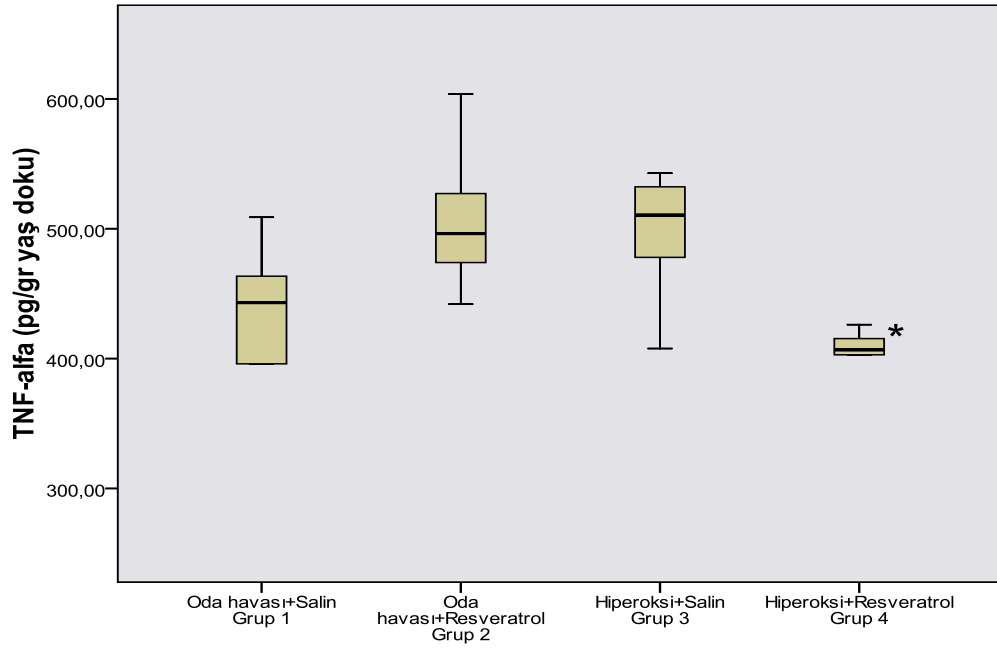
* Grup 4 < Grup 3 ($p<0.05$).



Şekil-7. Grupların IL-1 β düzeylerinin dağılımı



Şekil-8. Grupların IL-6 düzeylerinin dağılımı



*Grup 4 < Grup 3 (p<0,05).

Şekil-9. Grupların TNF- α düzeylerinin dağılımı

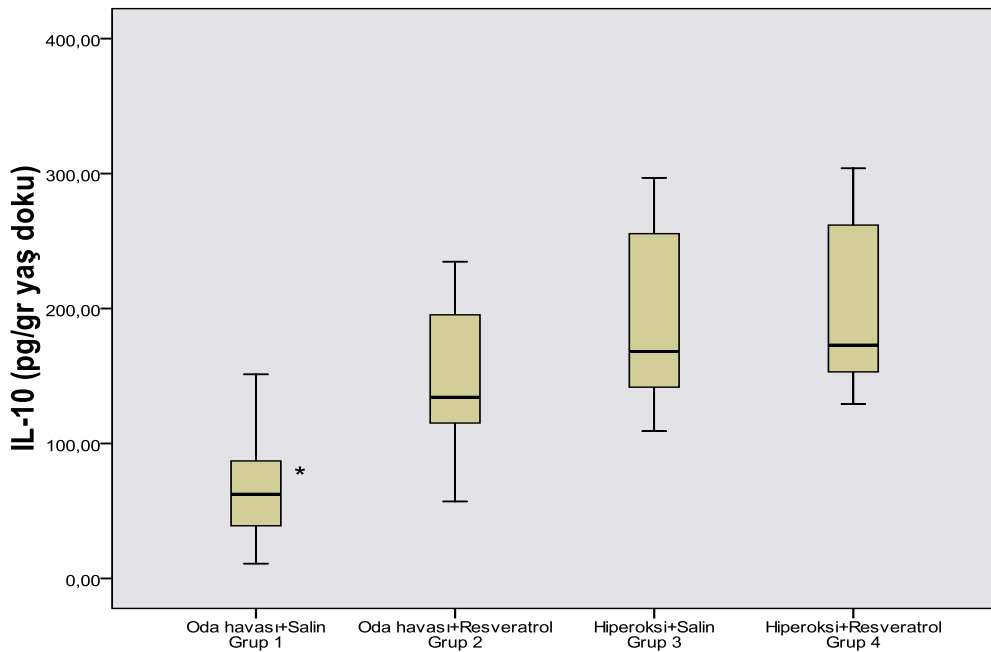
IL-10 Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu IL-10 düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 9'da belirtilmiştir. Oda havasında salin verilen gruba (Grup 1) kıyasla diğer tüm gruplarda IL-10 düzeyi belirgin olarak yüksek saptandı (p<0.01) (Şekil 10). Hiperoksi oluşturulan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, resveratrol verilen grupta (Grup 4) IL-10 düzeyi salin grubuna (Grup 3) göre yüksek olmakla birlikte farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).

Tablo 9. Deney gruplarının akciğer dokusu IL-10 düzeyleri ve karşılaştırılması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	(n=10)	(n=11)	(n=6)	(n=7)	
	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	
	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	
IL-10	62.37 *	134.23	168.11	172.82	<0.01
(pg/gr)	(11.01–151.20)	(57.04 – 234.76)	(109.11-296.91)	(129.11-303.86)	

*Grup 1<Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 (p<0.01).



*Grup 1< Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 (p<0.01).

Şekil 10. Grupların IL-10 düzeylerinin dağılımı

Antioksidan Enzim Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu GSH, GSH-Rd, GSH-Px ve SOD düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 10'da belirtilmiştir. Hiperoksiye maruz kalan gruplar GSH düzeyi bakımından değerlendirildiğinde, resveratrol verilen grupta (Grup 4) salin verilen gruba (Grup 3) göre GSH düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.01) (Şekil 11, Tablo 10).

Glutasyon redüktaz bakımından gruplar karşılaştırıldığında, en yüksek GSH-Rd düzeyi hiperoksi+resveratrol grubunda (Grup 4) bulunmakla birlikte aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 12, Tablo 10).

Glutasyon peroksidaz düzeyi bakımından gruplar karşılaştırıldığında, hiperoksiye maruz kalan ratlarda resveratrolün GSH-Px düzeyini salin grubuna göre arttırdığı görülse de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 13, Tablo 10).

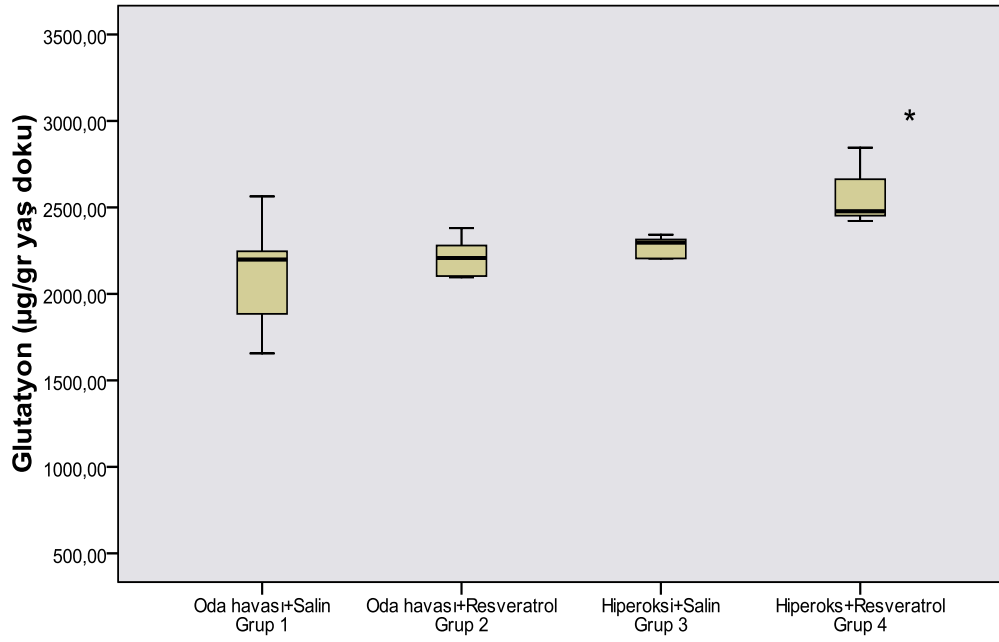
Süperoksit dismutaz düzeyi bakımından gruplar karşılaştırıldığında, SOD düzeyi resveratrol verilen gruplarda, salin verilen gruplara göre daha yüksekti. Bu fark oda havasında bulunan ratlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0.05$), hiperoksi grubunda resveratrolün SOD düzeyini anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 14, Tablo 10).

Tablo 10. Deney gruplarının akciğer dokusu antioksidan enzim düzeyleri ve karşılaştırılması

	Grup 1 (n=10) Ortanca (min-max)	Grup 2 (n=11) Ortanca (min-max)	Grup 3 (n=6) Ortanca (min-max)	Grup 4 (n=7) Ortanca (min-max)	<i>p</i>
GSH ($\mu\text{g/gr}$)	2198.73 (1656.05-2563.68)	2207.82 (646.39-2380.02)	2296.92 (1944.59-2342.37)	2477.10 * (2422.16-3225.90)	<0.01
GSH-Rd (mU/gr)	272.51 (151.71-331.79)	230.25 (140.86-370.64)	277.88 (95.58-364.35)	342.88 (303.04-607.30)	>0.05
GSH-Px (mU/gr)	516.70 (344.47-955.52)	443.86 (122.16-1286.84)	344.31 (255.16-964.40)	444.72 (334.00-733.33)	>0.05
SOD (ng/gr)	293.75 (280.66-307.30)	296.31 (279.30-309.55)	271.56 (261.66-280.99)	312.18 ** (261.47-377.03)	<0.05

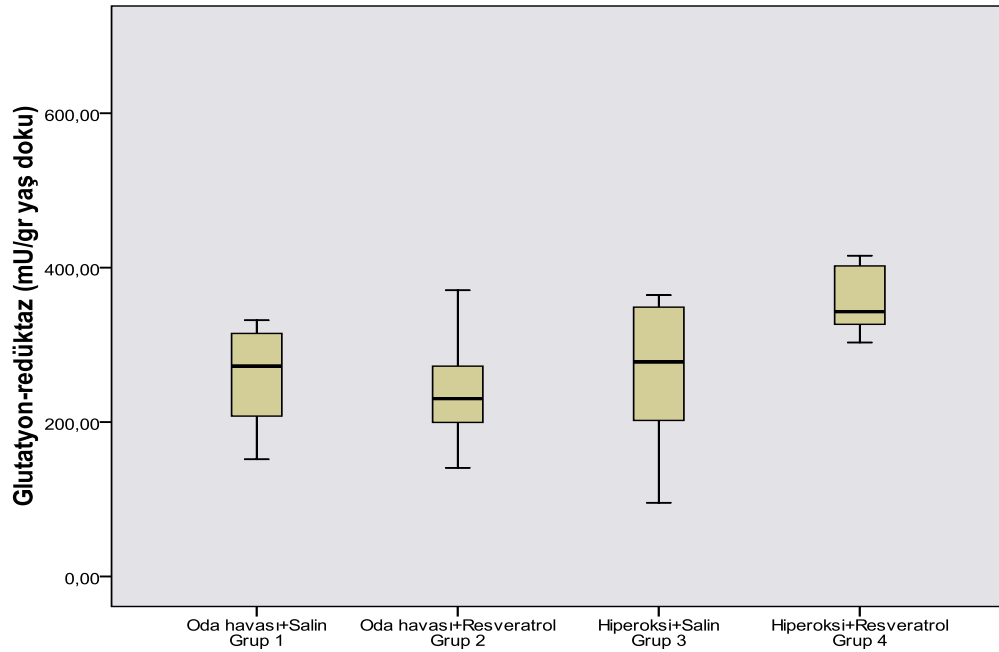
* Grup 4>Grup 3 ($p<0.01$).

** Grup 4>Grup 3 ($p<0.05$).

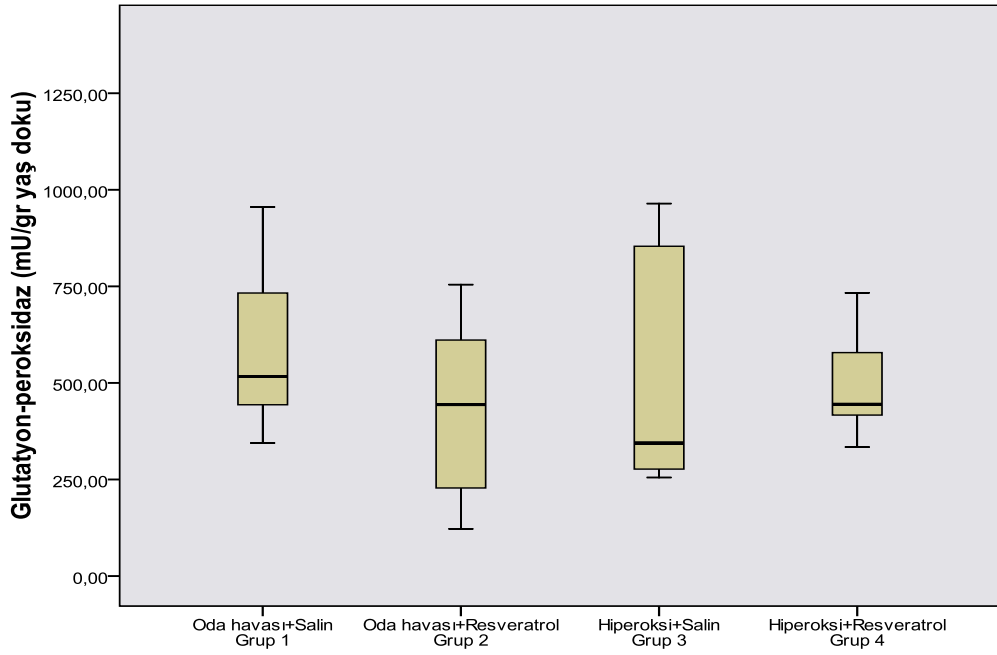


* Grup 4>Grup 3 (p<0.01).

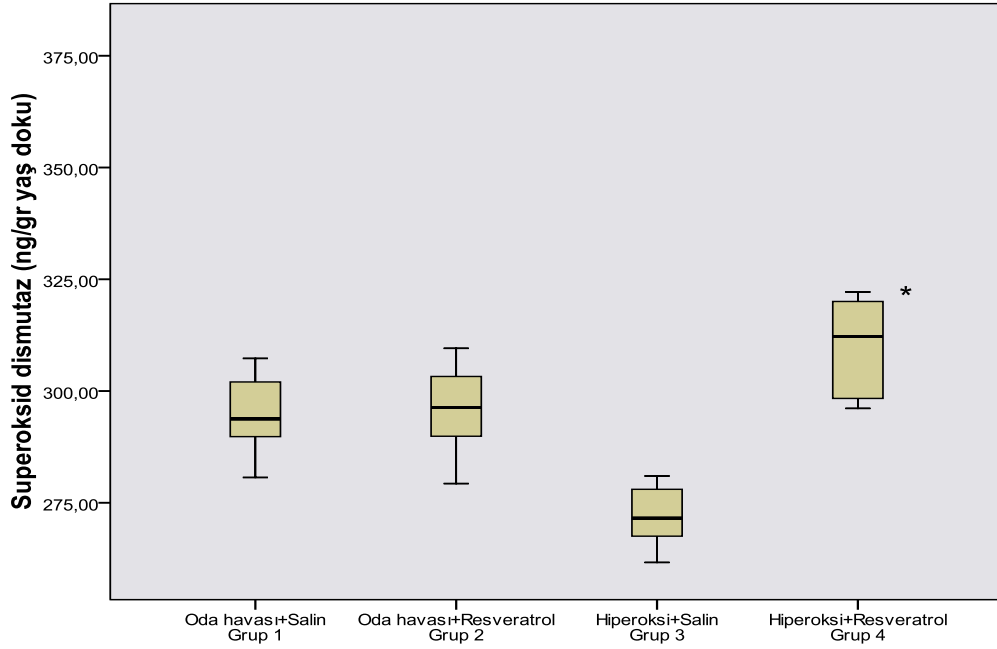
Şekil 11. Grupların GSH düzeylerinin dağılımı



Şekil 12. Grupların GSH-Rd düzeylerinin dağılımı



Şekil 13. Grupların GSH-Px düzeylerinin dağılımı



* Grup 4>Grup 3 (p<0.05)

Şekil 14. Grupların SOD düzeylerinin dağılımı

Oksidatif Stres Belirteci Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu MDA, MPO ve NO düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 11’de belirtilmiştir. MDA düzeyi hiperoksiye maruz bırakılan ratlardan resveratrol verilen grupta salin verilen gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Şekil 15). Gruplar MPO düzeyi bakımından değerlendirildiğinde hiperoksi+resveratrol verilen grupta (Grup 4) MPO düzeyi hiperoksi+salin grubuna (Grup 3) göre daha düşüktü, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 16, Tablo 11).

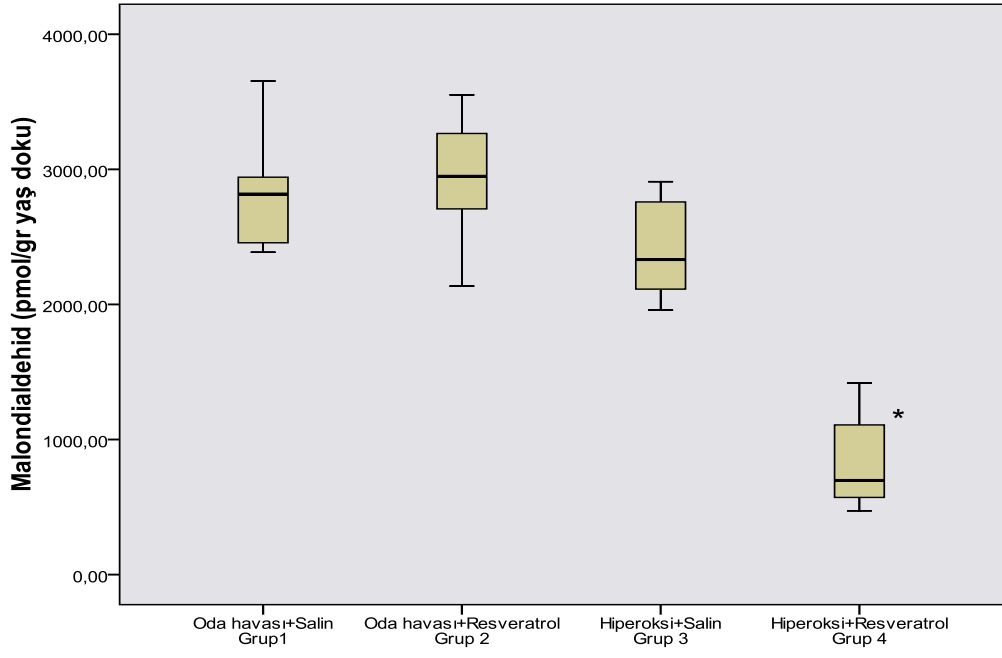
Nitrik oksit düzeyi bakımından gruplar karşılaştırıldığında NO düzeyinin hiperoksi+salin grubunda (Grup 3) diğer gruplara göre en yüksek düzeyde olduğu ve hiperoksi grubunda resveratrolün NO düzeyini belirgin olarak azalttığı saptandı ($p<0.01$) (Şekil 17, Tablo 11).

Tablo 11. Deney gruplarının akciğer dokusu oksidan stres belirteci düzeyleri ve karşılaştırılması

	Grup 1 (n=10) Ortanca (min-max)	Grup 2 (n=11) Ortanca (min-max)	Grup 3 (n=6) Ortanca (min-max)	Grup 4 (n=7) Ortanca (min-max)	<i>p</i>
MDA (pmol/gr)	2815.89 (2386.09-3653.38)	2948.33 (2135.69-3551.12)	2331.80 (1958.00-2908.73)	697.26 * (472.80-1938.95)	<0.01
MPO (U/gr)	276.89 (49.0-480.28)	350.99 (133.71-553.51)	610.55 (211.79-884.08)	373.72 (231.23-892.06)	>0.05
NO (mM/gr)	0.1392 (0.12-0.34)	0.1480 (0.10-0.18)	0.2463 ** (0.17-0.89)	0.1649 (0.12-0.21)	<0.05

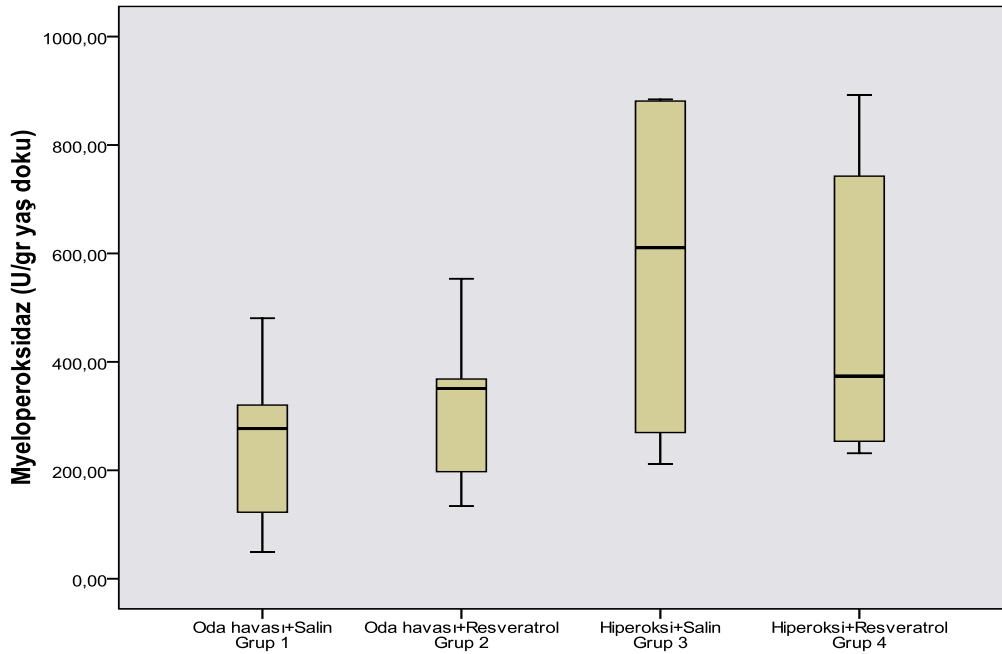
* Grup 4<Grup 3, ($p<0.01$).

** Grup 3>Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 ($p<0.05$).

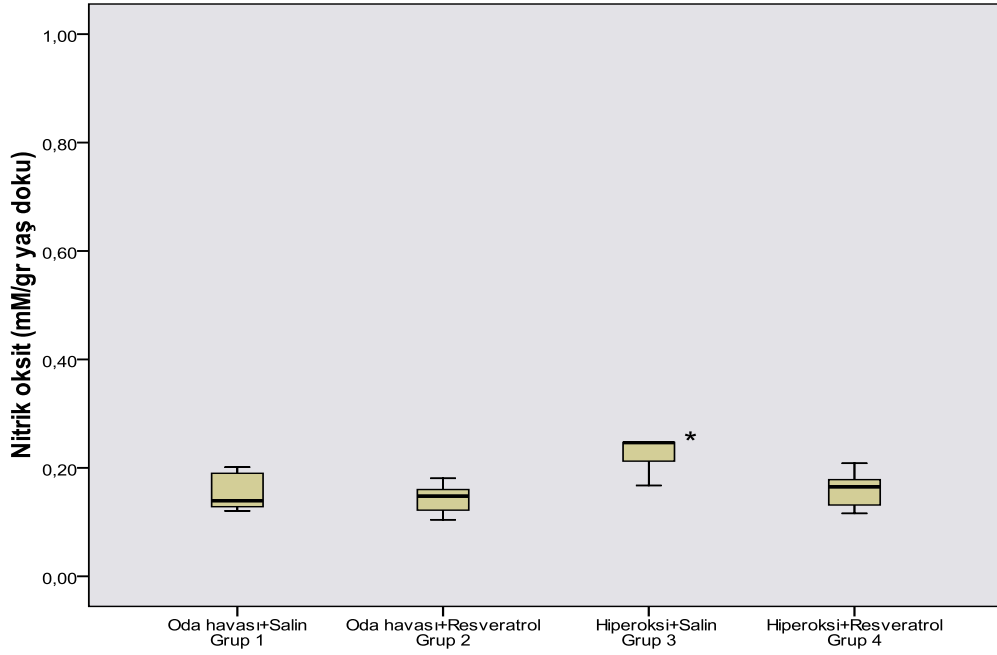


* Grup 4<Grup 3 (p<0.01).

Şekil 15. Grupların MDA düzeylerinin dağılımı



Şekil 16. Grupların MPO düzeylerinin dağılımı



* Grup 3>Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 (p<0.05).

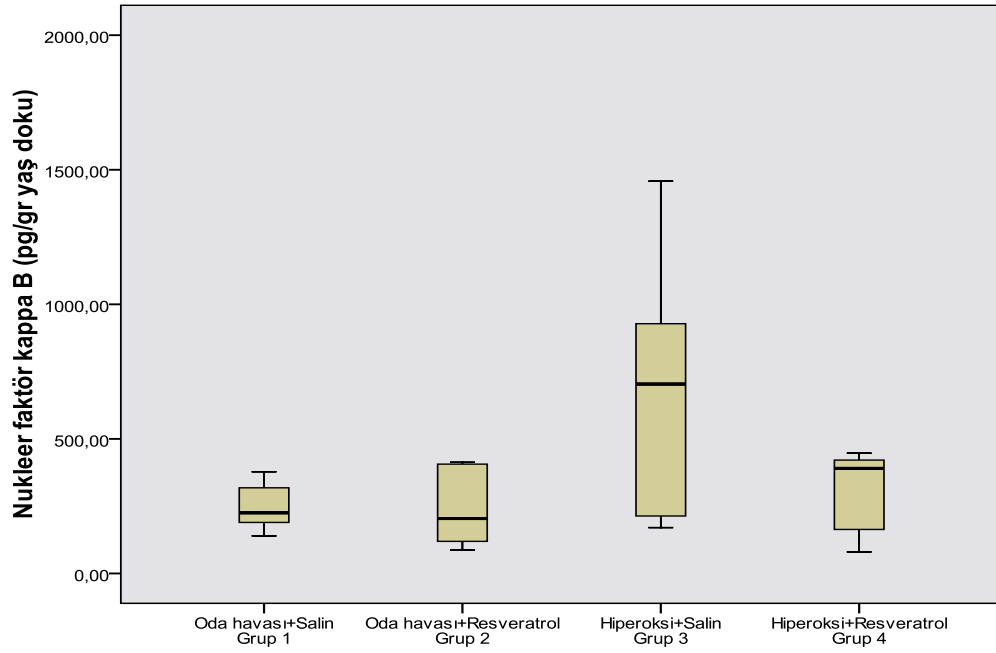
Şekil 17. Grupların NO düzeylerinin dağılımı

NFκB Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu NFκB düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 12’de belirtilmiştir. Hiperoksiye maruz bırakılan ve oda havasında bulunan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında resveratrol verilen gruplarda NFκB düzeyi daha düşüktü, ancak tüm gruplar NFκB düzeyi bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05) (Şekil 18, Tablo 12).

Tablo 12. Deney gruplarının akciğer dokusu NFκB düzeyleri ve karşılaştırılması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	(n=10)	(n=11)	(n=6)	(n=7)	
	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	
	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	
NFκB	225.16	203.75	703.89	390.69	>0.05
(pg/gr)	(139.67-746.85)	(87.17-1959.68)	(170.38-1457.62)	(79.97-446.95)	



Şekil 18. Grupların NFκB düzeylerinin dağılımı

TARTIŞMA

Yenidoğan yoğun bakım alanındaki tüm gelişmelere rağmen, BPD preterm doğumun en sık görülen uzun dönem komplikasyonlarından biri olmaya devam etmektedir. Riskli yenidoğanların özellikle prematürelere yaşatılma oranlarının artması BPD sıklığının artmasına yol açmıştır. Neonatolojideki modern ve güncel uygulamaların etkisiyle BPD'nin epidemiyolojisi, ortaya çıkış şekli, kliniği, radyolojik ve patolojik bulguları değişim göstermiş, bu değişim BPD'nin isimlendirme ve tanımlanmasına da yansımıştır (13). Eski ve yeni BPD arasındaki farklılıklar, etiyolojik risk etmenleri, izlem ve tedavi protokolleri, koruyucu önlemlerle ilgili klinik ve histopatolojik çalışmalar devam etmektedir (11).

Bronkopulmoner displaziye neden olan birçok risk faktörü tanımlanmaktadır. Bu risk faktörlerinin bir kısmı önlenemez olmakla birlikte, etiyolojide immatürite, barotravma/volütravma, oksidan stres, intrauterin başlangıcı da olabilen infeksiyon/inflamasyon ve proteolitik zedelenme mekanizmaları ile bazı antenatal faktörler yoğun olarak sorumlu tutulmakta ve araştırmalar bu konulara yoğunlaşmış durumdadır (2).

Mekanik ventilatör ihtiyacı olmayan ve/veya RDS olmayan erken doğmuş bebeklerde de BPD'nin görülmesi araştırmaları inflamasyona yönlendirmiştir. Koriyoamniyonit ve postnatal dönemde gelişen infeksiyonlar, inflamatuvar sitokin yanıtına neden olarak BPD oluşumuna katkıda bulunmaktadır. BPD'de proinflamatuvar mekanizmalar lehine inflamasyondaki dengesizliği gösteren kanıtlar artmaktadır. Ortaya çıkan inflamatuvar yanıt; hava yolu ve akciğer dokusunda nötrofil ve makrofaj birikimi, alveolokapiller yapı ile doku bütünlüğünü bozan proinflamatuvar mediatörlerin birikimi ile karakterizedir (5, 19). Ancak BPD'nin önlenmesinde antiinflamatuvar olarak kullanılan sistemik steroidlerin, olumsuz nörogelişimsel sonuçları ve diğer yan etkileri nedeniyle sadece yüksek riskli hasta gruplarında kullanılması önerilmektedir (28).

Yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli oksijen kullanımı ile BPD gelişimi arasındaki ilişki bilinmektedir. Prematüre bebekler akciğer immatüritesi nedeniyle sıklıkla yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalmaktadır. Bu bebeklerin

antioksidan sistemlerindeki yetersizlik, yüksek yoğunlukta ve uzun süreli oksijen tedavisi oksidatif stres ile akciğer hasarına neden olmaktadır. Deneysel hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında; hiperoksi, hipoksi, mekanik ventilasyon ve yetersiz beslenme gibi birçok faktörün etkisiyle, ortak son yol net olarak bilinmese de akciğer septasyonunun azaldığı bilinmektedir (4). Bu amaçla antioksidan kapasiteyi arttırmak için SOD ve GSH tedavileri denenmiş, ancak sonuçlar beklenildiği gibi iyi olmamıştır (28).

Özellikle yeni BPD için etkinliği kanıtlanmış bir tedavi bulunmamakta ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, gelişim evresi insanlardaki geç sakküler ve erken alveoler dönem ile uyumlu olan immatür akciğerlere sahip yenidoğan ratlarda hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturularak, resveratrolün akciğer dokusunda; alveol yüzey alanı, fibrozis, düz kas hiperplazisi, oksidan stres belirteçleri ve antioksidan enzimler ile proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkileri araştırıldı.

Yetersiz enerji ve protein alımı, solunum iş yükü ve katabolizmanın artması nedeniyle BPD'li bebeklerde büyüme geriliği sık görülmektedir. Ancak bu bebeklerdeki büyüme geriliğinin esas olarak malnütrisyonu bağlı olduğu düşünülmektedir (62). Çalışmamızda deneyden önce gruplardaki rat ağırlıkları arasında farklılık yokken, deney sonunda hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda rat ağırlıklarının anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü (Bkz. Tablo 4). Bu sonuçlar hiperoksik akciğer hasarı oluşturularak yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir (63). Çalışmamızda hiperoksiye maruz kalan ratlardan resveratrol verilen grupta kilo alımı bir miktar daha fazla idi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Yeni BPD'nin histopatolojik bulguları; basit ve az sayıda alveol, alveol yüzey alanında azalma ile karakterize alveolarizasyonda bozulmadır. Alveoler formasyon, sakküler evreden alveoler evreye geçişin görüldüğü, gebeliğin otuz ikinci haftasında başlayan ve geç postnatal dönemde de devam eden bir süreçtir. Sekonder krestler (alveollerin progenitörleri) ve alveol ağzında elastik fibrillerin birikimi nedeniyle elastinin yeni alveol gelişiminde önemli rolü olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle elastik fibrillerin birikiminde oluşabilecek anormalliklerin alveolarizasyonun

bozulmasında önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (64). Bruce ve arkadaşlarının çalışmasında (65) hiperoksinin ratlarda elastik fibrillerin uzunluğunda ve yapısında değişime (daha kısa ve kıvrımlı fibriller) neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hiperoksiye maruziyetin uzamasının kollajen yapısında ve birikiminde, elastik fibrillerin birikiminde bozulmaya neden olduğu belirtilmiştir. Bu bozulmanın volüt travma ve barotravmanın etkisiyle oluşan serbest oksijen radikallerine ve inflamasyona sekonder geliştiği öne sürülmektedir (64).

Benzer hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturulmuş diğer hayvan çalışmalarındaki gibi çalışmamızda da hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda alveol yüzey alanında belirgin azalma olduğu görüldü (53) (Bkz. Tablo 5). Hiperoksiye maruz bırakılan ratlardan resveratrol verilen grubun hiçbirinde alveol yüzey alanında belirgin azalma görülmezken, yarısından azında orta derecede azalma olduğu saptandı. Bu anlamda hiperoksiye maruz kalan ve salin verilen gruba kıyasla resveratrol hiperoksiye bağlı akciğer hasarlanmasını bir miktar azaltıyor gözükse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Resveratrol'den alveol yüzey alanı bakımından beklediğimiz faydayı göremememizin, alveoler formasyonda; platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), VEGF ve benzeri başka büyüme faktörlerinin de etkili olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz (37).

Sümfaktanın klinik kullanıma girmesinden önce BPD'nin başlıca histopatolojik bulguları havayolunda remodeling ve parenkimal fibrozis iken, daha sonra BPD nedeniyle ölen bebeklerin akciğer incelemelerinde daha az fibrozis olduğu belirtilmektedir. Günümüzde ise yeni BPD'nin özelliklerini daha büyük ve basit yapıda alveollerle karakterize septasyonda duraksama, fibroblastlara benzer hücreler ve kollajen içeriğinin artması nedeniyle septalarda kalınlaşma oluşturmaktadır (11, 16).

Yapılan çalışmalarda BPD'li yenidoğanların hava yolu sekresyonlarında önemli oranda TGF- β artışı olduğu saptanmıştır (19). RDS'li bebekler üzerinde yapılan bir çalışmada postnatal dördüncü günde alveoler septalarda SMA-pozitif myofibroblastların varlığı gösterilmiştir. TGF- β 'nin septaların duvarlarında bulunan bu hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı öne sürülmektedir (66, 67). Dasgupta ve arkadaşlarının çalışmasında (68) hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş hayvan

modelinde, hiperoksiye bağlı hasarın TGF- β aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle BPD'deki doku zedelenmesinden sorumlu tutulan en önemli mekanizmalardan birinin, TGF- β 'nin ve reseptörlerinin aşırı üretiminden kaynaklanan hatalı tamir mekanizmaları ve fibrozis olduğu düşünölmektedir (67). Bizim çalışmamızda da hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturularak salin verilen ratların tamamında fibrozis gelişirken, bunların üçte birinde belirgin fibrozis saptanmıştır (Bkz. Tablo 6). SMA skoru açısından değerlendirildiğinde, benzer şekilde en yüksek skor hiperoksi+salin verilen grupta görölmüştür (Bkz. Tablo 7). Ayrıca çalışmamızda hiperoksi grubunda resveratrol verilen hiçbir ratta belirgin fibrozis görölmezken, resveratrolün SMA skorunu salin verilen gruba göre anlamlı şekilde düşürdüğu saptanmıştır. Resveratrolün TGF- β 'yı inhibe ederek akciğerlerde fibroblastların myofibroblastlara dönüşümünü engellediği Fagone ve arkadaşları (69) tarafından gösterilmiştir. Bir başka çalışmada deneysel olarak rat akciğerinde fibrozis oluşturulmuş ve resveratrolün fibrozisi önlemesi antioksidan etkiye bağlanmıştır (7).

Resveratrol'ün fibrozis ve SMA ekspresyonunu azaltmadaki etkisi TGF- β inhibisyonu ve antioksidan etki dışında matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) inhibisyonu ile de ilişkilidir (70). Matriks metalloproteinazlar çinko içeren geniş bir enzim ailesidir ve embriyonik gelişim, anjiyogenezis, inflamasyon, yara iyileşmesi ve fibrozis gibi pek çok patofizyolojik olayda önemli rol oynamaktadır. Sadece matriks yıkımında değil, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi matriks dışı elemanların da proteolitik aktivasyonunda ve yıkımında görev alırlar. Matriks metalloproteinazları içinde gelatinazlar grubunda olan MMP-9 parenkimal organlarda inflamasyon gelişiminde rol oynayan önemli bir sitokin olup, nötrofil ve makrofajlardan salgılanmaktadır (71). Tambunting ve arkadaşlarının çalışmasında (72) ileri derecede prematüre babun akciğer dokusunda MMP-9 düzeyinin artışı BPD riskinin artışı ile ilişkili bulunmuştur. NIH tarafından preterm bebekler üzerinde yapılan bir çalışmada, sağlıklı ve BPD'li bebeklerde 25 sitokinin kan düzeyleri karşılaştırılmış; BPD'li ve ölen bebeklerde MMP-9 düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir (73). Li ve arkadaşlarının resveratrolün MMP-9 düzeyi üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmasında (74), resveratrolün NF κ B ve AP-1 inhibisyonu ile MMP-9 ekspresyonu ve üretimini azalttığı gösterilmiştir.

Bronkopulmoner displazi gelişimi ile yakın ilişkisi kanıtlanmış başka bir kemokin, makrofaj inhibitör protein 1- α 'dır (MIP 1- α). MIP1- α 'nın hava yolu sekresyonlarında erken dönemde artışı, sonradan gelişecek pulmoner fibrozisin göstergesi olarak kabul edilmektedir (5). Resveratrolün bir diğer antifibrotik özelliği de inflamasyon sonrası ortaya çıkan ve fibrozis gelişimine neden olan MIP1- α ekspresyonunu azaltmasıdır (50).

Çalışmamızda hiperoksiye maruz bırakılan ve resveratrol verilen ratlarda belirgin fibrozis görülmemiş olsa da gruptaki tüm ratlarda hafif veya orta düzeyde fibrozis saptanmıştır. Bu durum, fibrozis ve düz kas hiperplazisine neden olan konnektif doku büyüme faktörü gibi farklı sinyal yollarının etkisinden kaynaklanıyor olabilir (75, 76).

Bronkopulmoner displazi gelişiminde önemli patofizyolojik mekanizmalardan birisi, antenatal dönemde oluşan inflamasyon ve/veya infeksiyondur. Bunun histolojik veya klinik olarak en tipik örneği korioamnionittir. Erken postnatal dönemde geçirilen sistemik veya pulmoner infeksiyonlar da benzer şekilde etki etmektedir. Korioamnionit varlığında çok sayıda sitokin salınması ile karşı karşıya kalan akciğerlerde; postnatal resüsitasyon, mekanik ventilasyon veya oksijen tedavisinin eklenmesi akciğer zedelenmesi, pulmoner inflamatuvar cevap, anormal yara iyileşmesi, fibrozis ve sonuçta alveolarizasyon ve vasküler gelişimin inhibisyonu ile karakterize BPD tablosunu oluşturmaktadır. Bu süreçte; inflamatuvar hücrelerin kemotaksis ve endotelial adhezyonu, plazma proteinlerinin aktivasyonu ve alveolokapiller membranda geçirgenlik artışı, pro ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulması özellikle etkili olmaktadır (11, 75).

Mekanik ventilasyonun başlamasıyla beraber RDS'li bebeklerde normalde birinci saatte izlenen periferik kanda nötrofil sayısının azalması ve bronkoalveoler sıvıda nötrofil ve makrofaj artışının, BPD gelişecek prematüre bebeklerde daha belirgin olduğu ve haftalarca devam ettiği gösterilmiştir. Ağır RDS'si olan ve erken dönemde ölen prematüre bebeklerin postmortem çalışmalarda akciğer dokularında nötrofillerde 10 kat, makrofajlarda 15 kat artış olduğu bildirilmiştir (77).

İnflamatuvar cevabın başlatılmasında nötrofillerin endotelial hücre adhezyon moleküllerine bağlanması anahtar olaydır. BPD gelişen bebeklerde hava yolu sekresyonlarında ve plazmada adhezyon moleküllerinin arttığı belirlenmiştir. Mekanik ventilasyon ve oksijen tedavisi ile plazma proteinleri aktive olmakta ve koagülasyon, fibrinoliz, kompleman ve kinin-kallikrein sistemleri harekete geçmektedir. Bunların sonucunda alveolokapiller membran etkilenmekte, aktive nötrofiller ve trombositler pulmoner vasküler yatağa geçerek inflamasyonu tetiklemektedir. BPD gelişen yenidoğanların hava yolu sekresyonlarında IL-1 β , IL-6 IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler yüksek oranlarda saptanmıştır (5, 78).

Bronkopulmoner displazi etiyopatogenezindeki rolü düşünüldüğünde çalışmamızda da hiperoksinin proinflamatuvar sitokin düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Oda havası ve hiperoksi ortamında salınan veriler ratlar karşılaştırıldığında IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri hiperoksi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek bulunmuştur. Hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturulan ratlarda, salınan gruba ile karşılaştırıldığında resveratrolün, IL-1 β ve IL-6'yı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalttığı, ancak TNF- α 'yı belirgin olarak düşürdüğü saptanmıştır (Bkz. Tablo 8). Kronik bronşit modeli oluşturulmuş farelerde resveratrolün antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, TNF- α düzeylerinde düşüş sağladığı gösterilmiştir (79). Li ve arkadaşlarının RSV ile infekte fareler üzerinde yaptığı çalışmasında (80), infeksiyonun bronkoalveoler sıvıda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini arttırdığı ve profilaktik olarak verilen resveratrolün üç proinflamatuvar sitokin düzeyinde de düşüş sağladığı rapor edilmiştir. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu için NF κ B aktivasyonu gerekmekte, resveratrol ise NF κ B kinazı inhibe ederek antiinflamatuvar etki göstermektedir (8, 9).

Pro- ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik kronik akciğer hastalığı gelişimindeki önemli etmenlerden birisidir. Proinflamatuvar sitokin aktivite artışının dengelenmesinde antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un önemli görevleri olduğu bildirilmiştir (81). Çalışmamızda oda havasında bulunan ratlarla karşılaştırıldığında, hiperoksiye maruz kalan ratların akciğer dokusunda IL-10 düzeyi daha yüksek saptandı. Literatürde BPD ve IL-10 düzeyleri ilişkisi konusunda

çelişkili veriler bulunmaktadır (73, 82, 83). BPD'li hastalarda bronkoalveoler sıvıda düşük IL-10 düzeyleri gösterilmiş ve BPD gelişen bebeklerin plasenta IL-10 ekspresyonunun düşük olduğu belirtilmiştir (82, 83). NIH tarafından 1067 preterm bebek üzerinde yapılan çalışmada BPD'li bebeklerle sağlıklı bebekler karşılaştırıldığında; BPD'li bebeklerde IL-10 düzeyinin çalışmamızda olduğu gibi daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (73). Çalışmamızda hiperoksi grubunda resveratrolün salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da IL-10 düzeyini bir miktar arttırdığı bulundu (Bkz. Tablo 9). Yüksek dozlarda anti-diyabetik etkisi olduğu düşünülen resveratrolün diyabet oluşturulmuş fareler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada IL-10 düzeylerinde artış sağladığı belirtilmiştir (84).

Hiperoksik akciğer hasarı mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar sonucunda BPD tedavisine yön verebilecek geniş bir bilgi birikimi ortaya çıkmıştır. Hiperoksiye yanıt olarak, hücre içi ROS'un arttığı; proteinaz/antiproteinaz dengesinin bozulduğu; inflamasyon ve stres yanıtının ortaya çıktığı; hücresel büyüme ve farklılaşma düzeninin bozulduğu görülmüştür. Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile orantılı olarak, akciğer endotel ve epitel hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir. Hiperoksi distal havayollarında dallanmayı baskılayarak, gelişimin duraklamasına neden olmaktadır (4).

Yenidoğanlarda özellikle de prematüre bebeklerde bu faktörler oksidatif stresin artmasına katkıda bulunmaktadır. Preterm bebekler akciğerleri gelişmemiş olduğundan sıklıkla oksijen tedavisi ve hiperoksiye maruz kalmaktadır. Hiperoksiye yanıtta antioksidan savunma kapasiteleri yetersizdir. Ayrıca, preterm bebekler sıklıkla ROS üretimini aktive eden proinflamatuvar sitokin salınımına yol açan infeksiyon ve inflamasyona maruz kalmakta ve toksik ROS üretimini katalizleyen serbest demir term bebeklere göre preterm bebeklerin doku ve plazmalarında daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında preterm bebeklerde oksijen tedavisi oldukça dikkat ve önem arz etmektedir (4, 43).

Yüksek oksijen, ROS ve oksijen radikalleri üretiminden dolayı toksiktir. Bu bileşikler potansiyel olarak proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve DNA gibi temel hücre bileşenlerinde hasara neden olmaktadır. Vücudun bu oksidatif streslere karşı bazı savunma mekanizmaları vardır. Antioksidan sistemdeki sellüler, ekstrasellüler

ve membranöz ürünler otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önlemek için sebest radikallerle reaksiyona girmektedir. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki bu dengenin bozulması, BPD patofizyolojisindeki doku hasarının önemli nedenlerinden birisidir (43, 85).

Çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturulan ratlarda GSH, GSH-Rd, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimleri ve lipid peroksidasyon ürünü MDA ile oksidatif stres belirteçlerinden NO ve MPO düzeylerini ve bunlara resveratrolün etkilerini inceledik. Oda havasıyla hiperoksi grupları karşılaştırıldığında, hiperoksi durumunda bir miktar GSH-Px ve SOD düzeylerinde azalma saptansa da antioksidan sistemlerde (GSH, GSH-Px, GSH-Rd ve SOD) istatistiksel bir farklılık bulunmadığı görüldü. BPD’de SOD, GSH ve prekürsörleriyle tedavi maksatlı yapılan çalışmalarda da başarılı sonuçlar bildirilmemektedir (28).

Resveratrolün doğal antioksidan özelliği üç farklı mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlar; koenzim Q ile yarışarak ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak ve fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu özellikleri diğer güçlü antioksidanlardan daha zayıftır. Resveratrol in vitro koşullarda ROS’un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen, in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlev görmektedir. Nitrik oksit süperoksidini yakalama özelliği de bulunan resveratrol, biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının devamlılığını sağlamaktadır (86).

Resveratrolün hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde GSH, GSH-Px, GSH-Rd ve glutatyon-S-transferaz gibi GSH metabolizması ile ilgili enzimlerin miktarını arttırdığı gösterilmiştir (87). Spainer ve arkadaşlarının çalışmasında (88) resveratrolün SOD ve GSH ekspresyonunu düzenleyerek endotelial oksidatif hasarı önlediği belirtilmiştir. Şener ve arkadaşlarının çalışmasında (7) bleomisin ile rat akciğerlerinde fibrozis oluşturulmuş, bleomisin GSH düzeylerinde düşüşe neden olurken, resveratrolün GSH düzeyini anlamlı

derecede arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ise resveratrol tedavisinin hiperoksi grubunda GSH ve SOD düzeylerini belirgin olarak arttırdığı saptandı (Bkz. Tablo 10).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturmaktadır. Hücre membranında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, ROS oluşumuna neden olmakta bu da hücre hasarının önemli bir nedeni olarak görülmektedir. Lipid peroksitlerinin yıkılmasıyla çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşmaktadır. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilmekte ya da yayılarak hücrenin diğer bölümlerinde hasar oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonunun, zar işlevini bozması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürün olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu belirtilmektedir. MDA, oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonu son ürünüdür ve lipid hasarının önemli bir göstergesidir (44, 89).

Bronkopulmoner displazi patogeneğinde oksidatif stres sonucu MDA düzeyinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Preterm bebeklerde idrarda MDA düzeyinin, hastaya verilen oksijen konsantrasyonu ile korelasyon gösterdiği ve BPD gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (90). Çalışmamızda oda havasıyla hiperoksiye maruz bırakılan ratlar MDA bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir farklılık bulunmazken, hiperoksi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında resveratrol verilen grupta salin verilen gruba göre MDA düzeyinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (Bkz. Tablo 11).

Koroner oklüzyonla kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan bir çalışmada, resveratrolün koronerlerde MDA düzeyini azalttığı rapor edilmiştir (91). İskemi ve reperfüzyon hasarı dokuda lipid peroksidasyonunu artırmakta, sonuç olarak peroksi radikaller oluşmaktadır. Resveratrolün kardiyoprotektif etkisi antioksidan özelliği ve özellikle de peroksi radikal süpürücü etkisinden kaynaklanmaktadır (87). Biz de çalışmamızda hiperoksi grubunda resveratrolün MDA' yı belirgin olarak azalttığını gösterdik.

Bronkopulmoner displazide inflamasyon ve oksidatif hasarın rolü düşünülürken; inflamasyonun etkisiyle ortaya çıkan MPO'nun oksidan hasarı tetiklemesi etiyopatogeneizde önemli rol oynamaktadır (5). Nötrofil ve monositler fagositoz için hem oksijene bağımlı hem de oksijenden bağımsız mekanizmaları kullanmaktadır. Oksijene bağımlı mekanizmalar, MPO sistemini ve oksijen türevi serbest radikallerin üretimini sağlayan başka bir sistemi içermektedir. MPO demir içeren bir hem proteini olup, vücudun savunma sistemlerinde ve inflamatuvar doku hasarında görev almaktadır. Çeşitli uyarıların etkisiyle fagositer hücreler MPO içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltmakta ve fagosit aktivasyonu başlamaktadır. Tipik olarak fagosit aktivasyonu ve MPO sekresyonuna, NADPH'nin yükseltgenmesiyle beraber, süperoksit ve hidrojen peroksitin olduğu oksidatif bir reaksiyon eşlik etmektedir. MPO, hidrojen peroksit varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek, hipoklorik asit, hipoyodik asit ve hipobromik asit oluşturmaktadır. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidan etkileri olan moleküllerdir (92).

Çalışmamızda hiperoksiye maruz bırakılan ratlar oda havasında bulunan ratlarla karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında MPO düzeyinin daha yüksek olduğu görüldü, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, resveratrol tedavisinin MPO düzeyini düşürdüğü ancak bu düşüşün de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Bkz. Tablo 11). Bunun nedeni çalışmamızda kullandığımız resveratrol dozunun MPO düzeylerini etkileyebilecek konsantrasyona ulaşmaması olabilir, çünkü resveratrolün MPO ile etkileşimi ve inhibisyonunda doza bağımlı olduğu rapor edilmiştir (93).

Çalışmamızda yer verdiğimiz oksidatif stres belirteçlerinden bir diğeri NO olup, BPD'nin hem patofizyolojisinde hem tedavisinde rol oynamaktadır. NO hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli rolü olan serbest radikallerden biridir. Muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenmektedir. Nöronal NOS nöral iletide, endotelial NOS vasküler düz kas relaksasyonunda görev almaktadır. İndüklenebilir NOS (iNOS) ise normal şartlar

altında bulunmamakta, inflamasyon veya infeksiyon durumunda sitokinler veya endotoksinlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. İnflamasyonda iNOS etkisiyle, NO'nun SOD enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit oluşmaktadır. Böylece NO'nun fizyolojik etkisi inhibe edilmekte, oksidatif etkisi ortaya çıkmaktadır. Peroksinitrit, NO toksisitesinin başlıca sorumlusu olarak kabul edilmektedir. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit, hidroksil radikali, nitronyum iyonu gibi toksik ürünlere dönüşmektedir (94).

Bronkopulmoner displazi gelişiminde NO sentezi ve metabolizmasının etkisini açıklayan yeterli çalışma bulunmamaktadır. Hayvan deneyleri ise BPD'nin erken dönemlerinde iNOS ekspresyonunun ve NO üretiminin azaltılmasının kritik önemi olduğunu göstermektedir (95). Potter ve arkadaşları (96) ratlarda hiperoksinin iNOS ekspresyonu ve NO aktivitesini arttırdığını ve akciğer hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir. Dawis ve arkadaşları, çalışmalarında (95) BPD'li bebeklerde iNOS ekspresyonunun NO düzeyini arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde oda havasıyla karşılaştırıldığında hiperoksiye maruz kalan ratlarda NO düzeyinin anlamlı şekilde arttığı bulundu. Hiperoksiye maruz kalan ratlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise resveratrol tedavisinin NO düzeyini belirgin olarak azalttığı saptandı (Bkz. Tablo 11).

Oksidatif stres sürecinde NO seviyelerindeki artış çok hassas ve dinamik bir bulgudur. NO serbest radikal oluşumunda etkili bir maddedir ve bu etkisini diğer serbest radikallerin oluşumuna katkıda bulunarak dolaylı yoldan gerçekleştirmektedir. Pro-oksidatif bir enzim olan NOS'un inhibisyonu NO düzeyini azaltarak serbest radikal oluşumunu engelleyebilmektedir. Resveratrolün NOS aktivitesini inhibe ettiği ve oksidatif stres sonucu artan doku NO düzeylerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur (97). Tsai ve arkadaşları (98) aktive makrofajlarda, resveratrolün iNOS'un mRNA ekspresyonunun inhibisyonuyla NO üretimini belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir.

Bronkopulmoner displazi etiyopatogenezinde son dönemlerde üzerinde durulan diğer bir faktör NFκB'dir (99). NFκB nükleer transkripsiyon faktörü olup, immünite ve inflamasyon ile ilişkili çok sayıda gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde kritik

rol oynamaktadır. Bu proinflamatuvar genler interlökinleri, kemokinleri, adhezyon moleküllerini, reseptörleri ve enzimleri içermektedir. NFκB; TNF-α, IL-6 ve iNOS gibi inflamatuvar mediatörlerin ve ROS'ların gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludur (8). NFκB bu etkileri ile BPD'deki inflamasyonun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Mekanik ventilasyon uygulanan preterm bebeklerde alveoler makrofajlarda NFκB ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Başka bir çalışmada BPD'li preterm bebeklerde trakeal aspirat hücrelerinde NFκB düzeyinin artmış olduğu rapor edilmiştir (99, 100). Ventilatör bağımlı preterm bebeklerde deksametazonun NFκB aktivasyonunu inhibe ettiği ve NFκB etkisiyle salınan proinflamatuvar sitokinleri azalttığı belirtilmektedir (101). Prematüre bebeklerde steroid kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle BPD gelişiminde önemli rolü olan NFκB'nin inhibisyonunu sağlayacak diğer ilaçlar üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Aghai ve arkadaşları (102) prematüre bebeklere verilen azitromisin tedavisinin NFκB ve trakeal aspirat hücrelerinde proinflamatuvar sitokin (IL-6, IL-8 ve TNF-α) düzeylerine etkisini araştırmış ve ventile edilen prematüre bebeklerde steroide alternatif oluşturacak azitromisin etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız resveratrol antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerini NFκB ve AP-1 inhibisyonu üzerinden göstermektedir (8, 9, 98). Tsai ve arkadaşları çalışmalarında (98) resveratrolün makrofajlarda NFκB aktivasyonunu azalttığını, Manna ve arkadaşları (9) ise resveratrolün lipid peroksidasyonu ve ROS salınımı üzerine olan etkilerinin doz ve süre bağımlı olarak NFκB ve AP-1 inhibisyonu ile sağladığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda hiperoksiye maruz kalan ratlarda daha yüksek NFκB düzeyleri saptansa da gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı. Hiperoksiye maruz kalan ratlarda uygulanan resveratrol tedavisiyle NFκB düzeyinde azalma görüldü, ancak bu da istatistiksel olarak anlamlı değildi (Bkz. Tablo 12). Bu sonuçlarımızın Manna ve arkadaşlarının çalışmasında (9) belirtildiği gibi resveratrolün doza bağlı etkilerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda proinflamatuvar sitokinler IL-1β ve IL-6 düzeylerinde beklediğimiz anlamlı düşüşün

görülmemesi de aynı nedenle olabilir, çünkü resveratrolün bu sitokinlere etkisi NFκB kinaz inhibisyonu ile gerçekleşmektedir (8, 9).

Sonuç olarak, hiperoksik akciğer hasarlanma modeli oluşturularak yenidoğan ratlarda yapılan bu çalışmada; NO ve oksidan hasarın BPD etiopatogenezinde önemli bir rolünün olduğu, resveratrolün ise TNF-α, NO ve MDA'yı azaltarak, GSH ve SOD düzeylerini artırarak, hem antiinflamatuar hem de antioksidan etkileriyle hiperoksik akciğer hasarını önlemede etkili olduğu gösterildi, ancak BPD tedavisinde resveratrolün etkinliğini ve klinik kullanımını destekleyecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1. Hiperoksik akciğer hasarı modeli ile BPD oluşturulan çalışmada deney sonunda hiperoksiye maruz bırakılan ratların ağırlıkları oda havasında tutulanlara göre daha düşüktü ($p<0.001$).
2. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda alveol yüzey alanı skoru, fibrozis skoru ve SMA skoru oda havasında tutulanlara göre belirgin olarak daha yüksekti ($p<0.05$).
3. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda resveratrol tedavisinin salin grubuna göre alveol yüzey alanı skoru, fibrozis skoru ve SMA skorunu düşürdüğü görüldü, ancak bu etki alveol yüzey alanı ve fibrozis skoru bakımından anlamlı değilken (her iki skor için $p=0.074$), SMA skoru bakımından istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).
4. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri hiperoksiye maruz bırakılan grupta daha yüksek bulundu, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).
5. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda resveratrol tedavisinin salin grubuna göre proinflamatuvar sitokin düzeylerini azalttığı görüldü, ancak bu azalma IL-1 β ve IL-6 düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0.05$), TNF- α düzeyi için anlamlı idi ($p<0.05$).
6. Oda havasında bulunan ratlarla karşılaştırıldığında, hiperoksiye maruz kalan ratların akciğer dokusunda IL-10 düzeyi daha yüksek saptandı ($p<0.01$).
7. Salin verilen gruplarla karşılaştırıldığında, resveratrol verilen gruplarda IL-10 düzeyi daha yüksek saptandı. Bu fark hiperoksi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0.05$), oda havası grupları karşılaştırdığında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.01$).
8. Hiperoksi durumunda GSH-Px ve SOD düzeylerinde bir miktar azalma saptansa da, oda havasıyla hiperoksi grubu karşılaştırıldığında antioksidan sistemlerde (GSH, GSH-Px, GSH-Rd ve SOD) istatistiksel bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).
9. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda resveratrol tedavisinin salin grubuna göre antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı görüldü, ancak bu etki GSH-Rd

ve GSH-Px için istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0.05$), GSH ve SOD için anlamlı idi ($p<0.05$).

- 10.** Oda havasıyla hiperoksiye maruz bırakılan ratlar MDA bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir farklılık bulunmazken, hiperoksi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, resveratrolün salin grubuna göre MDA düzeyini anlamlı oranda düşürdüğü saptandı ($p<0.01$).
- 11.** Hiperoksi gruplarında MPO düzeyinin daha yüksek olduğu görüldü, ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, resveratrol tedavisinin MPO düzeyini düşürdüğü ancak bu düşüşün de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).
- 12.** Oda havasıyla karşılaştırıldığında hiperoksiye maruz kalan ratlarda NO düzeyinin anlamlı şekilde arttığı bulundu. Hiperoksiye maruz kalan ratlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise resveratrol tedavisinin NO düzeyini belirgin olarak azalttığı saptandı ($p<0.05$).
- 13.** Hiperoksiye maruz kalan ratlarda daha yüksek NF κ B düzeyleri saptansa da gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. Hiperoksiye maruz kalan ratlara uygulanan resveratrol tedavisiyle NF κ B düzeyinde azalma görüldü, ancak bu da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.086$).
- 14.** Bu sonuçlarla resveratrolün hiperoksik akciğer hasarını önlemede etkin olduğu görüldü.

KAYNAKLAR

1. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 2006;367(9520):1421-1431.
2. D'Angio CT, Maniscalco WM. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: pathophysiology and management strategies. *Paediatr Drugs* 2004;6(5):303-330.
3. Van Marter LJ. Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 2005;17(2):174-180.
4. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003;8(1):39-49.
5. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91(2):F132-135.
6. Martin AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2004;67(7):1399-1410.
7. Sener G, Topaloğlu N, Sehirli AO, Ercan F, Gedik N. Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20(6):642-649.
8. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(1):3-9.
9. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1 and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164(12):6509-6519.
10. Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967;276(7):357-368.

11. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(7):1723-1729.
12. Pusey VA, Macpherson RI, Chernick V. Pulmonary fibroplasia following prolonged artificial ventilation of the newborn infants. *Can Med Assoc J* 1969;100(10):451-457.
13. Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol* 2003;8(1):63-71.
14. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(2):147.e1-8.
15. Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2005;116(6):1353-1360.
16. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003;8(1):73-81.
17. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006;30(4):179-184.
18. Hayes D Jr, Feola DJ, Murphy BS, Shook LA, Ballard HO. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Respiration* 2010;79(5):425-436.
19. Bose CL, Damman CE, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93(6):F455-461.
20. Merritt TA, Deming DD, Boynton BR. The 'new' bronchopulmonary dysplasia: challenges and commentary. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(6):345-357.

21. Young KC, Del Moral T, Claire N, Vanburskirk S, Bnacalari E. The association between early tracheal colonization and bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 2005;25(6):403-407.
22. Lavoie PM, Pham C, Jang KL. Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health. *Pediatrics* 2008;122(3):479-485.
23. Oh W, Poindexter BB, Perritt R, Lemons JA, Bauer CR, Ehrenkranz RA, et al. Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *J Pediatr* 2005;147(6):786-790.
24. Mataloun MM, Leone CR, Mascerratti RS, Dohnnikoff M, Rebello CM. Effect of postnatal malnutrition on hyperoxia-induced newborn lung development. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(7):606-613.
25. Merrill JD, Ballard RA, Cnaan A, Hibbs AM, Godinez RI, et al. Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants. *Pediatr Res* 2004;56(6):918-926.
26. Watterberg KL, Scott SM, Backstrom C, Gifford KL, Cook KL. Links between early adrenal function and respiratory outcome in preterm infants: airway inflammation and patent ductus arteriosus. *Pediatrics* 2000;105(2):320-324.
27. Rossi UG, Owens CM. The radiology of chronic lung disease. *Arch Dis Child* 2005;90(6):601-607.
28. Laughon MM, Smith PB, Bose C. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(6):374-382.
29. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 2007;357(19):1893-1902.

30. Keller RL, Ballard RA. Bronchopulmonary dysplasia. In: Gleason CA, Devaskar SU, eds. *Avery's Diseases of the Newborn*, 9th Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2012;658-671.
31. Walsh M, Laptook A, Kazzi SN, Engle WA, Yao Q, Rasmussen M, et al. A cluster-randomized trial of benchmarking and multimodal quality improvement to improve rates of survival free of bronchopulmonary dysplasia for infants with birth weights of less than 1250 grams. *Pediatrics* 2007;119(5):876–890.
32. Doyle LW, Davis PG, Morley CJ, McPhee A, Carlin JB; DART Study Investigators. Low-dose dexamethasone facilitates extubation among chronically ventilator-dependent infants: a multicenter, international, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2006;117(1):75–83.
33. Shah VS, Ohlsson A, Halliday HL, Dunn M. Early administration of inhaled corticosteroids for preventing chronic lung disease in ventilated very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;(5):CD001969.
34. Onland W, Offringa M, van Kaam A. Late (≥ 7 days) inhalation corticosteroids to reduce bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;(4):CD002311.
35. Darlow BA, Graham PJ. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(10):CD000501.
36. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, et al. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics* 2008;121(5):882-889.
37. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 2005;57(5 Pt 2):38R-46R.

38. Tin W, Wiswell TE. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia: debunking the myths. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(6):383-390.
39. Doyle LW, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Dexamethasone treatment after the first week of life for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a systematic review. *Neonatology* 2010;98(4):289-296.
40. Lister P, Iles R, Shaw BNj, Ducharme FM. WITHDRAWN. Inhale steroids for neonatal chronic lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*; 2010;(1):CD002311.
41. Committee on Infectious Diseases. From the American Academy of Pediatrics: Policy statements-Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 2009;124(6):1694-1701.
42. Sarker AH, Watanabe S, Seki S, Akiyama T, Okada S. Oxygen radical-induced single strand DNA breaks and repair of the damage in cell-free system. *Mutat Res* 1995;337(2):85-95.
43. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005;88(3):228-236.
44. Halliwell B and Gutteridge J.M.C. Free radicals, other reactive species and disease. In: Halliwell B, Gutteridge J.M.C, eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed. Oxford University Press 1999;639–645.
45. Ehrenkranz RA. Vitamin E and neonate. *Am J Dis Child* 1980;134(12):1157-1166.
46. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol* 1990;264:155-163.
47. Sovak M. Grape extract, resveratrol and its analogs: A review. *J Med Food* 2001;4(2):93-105.

48. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of resveratrol. *Compreh Rev Food Sci Food Safety* 2006;(5):65-70.
49. Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res* 2006;53(1):6-15.
50. Nam NH. Naturally occurring NF-kappa B inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2006;6(8):945-951.
51. Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, et al. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J Appl Toxicol* 2008;28(1):35-43.
52. Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, Meszaros JG. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(3):H1131-1138.
53. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 1998;275(1):L110-117.
54. Kolgazi M, Sener G, Cetinel S, Gedik N, Alican I. Resveratrol reduces renal and lung injury caused by sepsis in rats. *J Surg Res* 2006;134(2):315-321.
55. Veness-Meehan KA, Moats-Staats BM, Price WA, Stiles AD. Re-emergence of a fetal pattern of insulin-like growth factor expression during hyperoxic rat lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16(5):538-548.
56. Stocker JT. Pathologic features of long-standing "healed" bronchopulmonary dysplasia: a study of 28 3- to 40-month-old infants. *Hum Pathol* 1986;17(9):943-961.
57. Ozer E, Sis B, Ozen E, Sakizli M, Canda T, Sarioglu S. BRCA1, c-erbB-2 and H-ras gene expressions in young woman with breast cancer. *An*

immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(1):12–18.

58. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*. 1998;94(6):623-632.
59. Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem*. 1998;44(3):679-681.
60. Racker E. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem* 1995;270(2):855-865.
61. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1998;34(3):497-500.
62. Ehrenkranz RA, Dusick AM, Vohr BR, Wright LL, Wraage LA, Poole WK. Growth in the neonatal intensive care unit influences neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2006; 117(4):1253-1260.
63. Demir K, Kumral A, Duman N, Sarioglu S, Yilmaz O, Yesilirmak DC, et al. Clarithromycin, montelukast, and pentoxifylline combination treatment ameliorates experimental neonatal hyperoxic lung injury. *J Maternal Fetal Neonatal Med* 2008;21(6):407-413.
64. Mascaretti RS, Mataloun MM, Dolhnikoff M, Rebello CM. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits. *Clinics(Sao Paulo)* 2009;64(11):1099-1104.
65. Bruce MC, Schuyler M, Martin RJ, Starcher BC, Tomashefski JF Jr, Wedig KE. Risk factors for degradation of lung elastic fibers in the ventilated neonate. Implications for impaired development in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(1):204-212.

66. Toti P, Buonocore G, Tanganelli P, Catella AM, Palmeri ML, Vatti R, et al. Bronchopulmonary dysplasia of the premature baby: an immunohistochemical study. *Pediatr Pulmonol* 1997;24(1):22-28
67. Vicencio AG, Lee CG, Cho SJ, Eickelberg O, Chuu Y, Haddad GG, et al. Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(6):650–656.
68. Dasgupta C, Sakurai R, Wang Y, Guo P, Ambalavanan N, Torday JS, et al. Hyperoxia-induced neonatal rat lung injury involves activation of TGF-(beta) and Wnt signaling and is protected by rosiglitazone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296(6):L1031–1041.
69. Fagone E, Conte E, Gili E, Fruciano M, Pistorio MP, Lo Furno D et al. Resveratrol inhibits transforming growth factor- β –induced proliferation and differentiation of ex vivo human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration. *Exp Lung Res* 2011;37(3):162-174.
70. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, et al. Activation of sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One* 2011;6(11):e27081.
71. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;82(6):1375-1381.
72. Tambunting F, Beharry KD, Hartleroad J, Waltzman J, Stavitsky Y, Modanlou HD. Increased lung matrix metalloproteinase-9 levels in extremely premature baboons with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2005;39(1):5-14.
73. Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2009;123(4):1132-1141.

74. Li YT, Shen F, Liu BH, Cheng GF. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinase-9 transcription in U937 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(11):1167-1171.
75. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate* 2001;79(3-4):205-209.
76. Chen S, Rong M, Platteau A, Hehre D, Smith H, Ruiz P, et al. CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300(3):L330-340.
77. Ferreira PJ, Bunch TJ, Albertine KH, Carlton DP. Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants. *J Pediatr* 2000;136(4):466-472.
78. Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994;93(5):712-718.
79. Şahin M, Yıldız F, Şirvancı S, Ercan F, Şahin D, Boyacı H. Comparison of anti-inflammatory effects of theophylline and resveratrol in chronic bronchitic rats. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2011;31(3):559-567.
80. Li J, Wang S, Xu J, Dai Q, Xu S, Sun H, et al. Regulation trend of resveratrol on TNF- α , IL-1 β , IL-6 expressions in bronchoalveolar lavage fluid RSV-infected BALB/c mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2012;37(10):1451-1454.
81. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996;39(6):966-975.

82. Oei J, Lui K, Wang H, Henry R. Decreased interleukin-10 in tracheal aspirates from preterm infants developing chronic lung disease. *Acta Paediatr* 2002;91(11):1194-1199.
83. Mc Gowan EC, Kostadinov S, McLean K, Gotsch F, Venturini D, Romero R et al. Placental IL-10 dysregulation and association with bronchopulmonary dysplasia risk. *Pediatr Res* 2009;66(4):455-460.
84. Dao TM, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, et al. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *PLoS One* 2011;6(6):e20700.
85. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant response to oxidant-mediated lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(2):L246-255.
86. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5): 1156-1160.
87. Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 2006;6(1):36-47.
88. Spainer G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (G-Px1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 2009;60(4):111-116.
89. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63(4):381-389.
90. Schlenzig JS, Bervoets K, von Loewenich V, Böhles H. Urinary malondialdehyde concentration in preterm neonates: is there a relationship to disease entities of neonatal intensive care? *Acta Paediatr* 1993;82(2):202-205.
91. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of

phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 1997;61(21):2103-2110.

92. Johnson RK, Nauseef WM. Molecular biology of MPO. In: Everse JE, Everse KE, Grisham MB, eds. *Peroxidases in chemistry and biology*. CRC Press, Amsterdam 1991;65-73.
93. Kohnen S, Franck T, Van Antwerpen P, Boudjeltia KZ, Mouithys-Mickalad A, Deby C, et al. Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. *J Agric Food Chem* 2007;55(20):8080-8087.
94. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Oxygen toxicity and Free Radical Injury In: *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*. 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland 1996;437-457
95. Dawis CW, Gonzales LW, Ballard RA, Ballard PL, Guo C, Gow AJ. Expression of nitric oxide synthase and endogenous NO metabolism in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2008;43(7):703-709.
96. Potter CF, Kuo NT, Farver CF, McMahon JT, Chang CH, Aganhi FH, et al. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity and lung injury in rat pups. *Pediatr Res* 1999;45(1):8-13.
97. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(6):1988-1995.
98. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation NFkappa B in macrophage by resveratrol. *Br J Pharmacol* 1999;126(3):673-680.
99. Bourbia A, Cruz MA, Rozycki HJ. NF-kappaB in tracheal lavage fluid from intubated premature infants: association with inflammation, oxygen and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91(1):F36-F39.

- 100.**Cao L, Liu C, Cai B, Jia X, Kang L, Speer CP, ET AL. Nuclear factor-kappa B expression in alveolar macrophages of mechanically ventilated neonates with respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 2004;86(2):116–123.
- 101.**Aghai ZH, Kumar S, Farhath S, Kumar MA, Saslow J, Nakhla T, et al. Dexamethasone suppresses expression of nuclear factor-kappaB in the cells of tracheobronchial lavage fluid in premature neonates with respiratory distress. *Pediatr Res* 2006;59(6):811–815.
- 102.**Aghai ZH, Kode A, Saslow JG, Nakhla T, Farhath S, Stahl GE, et al. Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. *Pediatr Res* 2007;62(4):483-488.