

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

HİPEROKSİK AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
RATLARDA BOSENTANIN AKCİĞERDEKİ HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ÖZGÜN TABAN

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR

DENİZLİ – 2018

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

HİPEROKSİK AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
RATLARDA BOSENTANIN AKCİĞERDEKİ HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ÖZGÜN TABAN

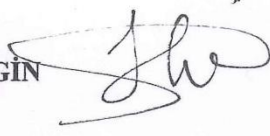
DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZMERT M.A. ÖZDEMİR

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 09.08.2017 tarih ve 2017TPF012 nolu kararı ile desteklenmiştir.

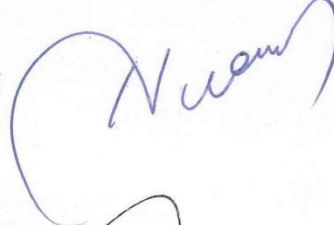
DENİZLİ – 2018

Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR danışmanlığında Dr. Özgün TABAN tarafından yapılan “Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda bosentanın akciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri” başlıklı tez çalışması 30/03/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

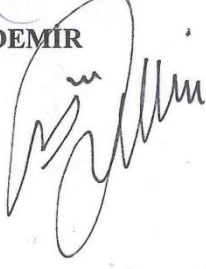
BAŞKAN: Prof. Dr. Hacer ERGİN



ÜYE: Prof. Dr. Hasan ÇETİN



ÜYE: Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 30/03/2018

Prof. Dr. Sermin Meliha FENKİCİ
Prof. Dr.
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde klinik bilgi ve deneyimleriyle çalışmayı yönlendiren, uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Özmert M.A. ÖZDEMİR'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Dolunay GÜRSES ve değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Hacer ERGİN, Prof. Dr. Selçuk YÜKSEL, Doç. Dr. Yılmaz AY, Doç. Dr. Selda Ayça ALTINCIK, Yrd. Doç. Dr. Bayram ÖZHAN, Yrd. Doç. Dr. Meltem POLAT, Yrd. Doç. Dr. Halil KOCAMAZ, Yrd. Doç. Dr. İlknur GİRİŞGEN, Yrd. Doç. Dr. Ebru Arık YILMAZ Yrd. Doç. Dr. Münevver YILMAZ'a,

Tez hazırlık aşamasında desteğini gördüğüm PAÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar ENLİ, PAÜ Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ferda BİR'e,

Bu zorlu eğitim sürecinde dostluklarıyla yanımda olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Seda ORPAK, Dr. Havva Nur ASILTÜRK ve Uzm. Dr. Feride MARIM'a, eğitim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım ve yan dal uzmanlarımıza,

Hayatımın her döneminde sevgi ve sabırlarıyla yanımda olan ve varlıklarından güç aldığım sevgili annem, babam ve kardeşim Dr. Sema TABAN'a içtenlikle 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	9
Klinik Bulgular ve Prognoz.....	15
Korunma.....	16
İlaç Tedavileri.....	19
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTiOKSİDANLAR	23
Hücre İçi Antioksidanlar.....	24
Membranda Bulunan Antioksidanlar	24
Hücre Dışı Antioksidanlar	24
BOSENTAN	24
GEREÇ VE YÖNTEM	27
HAYVAN MODELİ VE TEDAVİLER	27
İlaç Uygulaması.....	29
HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	29
Alveol Yüzey Alanının Semikantitatif Ölçümü	29
Fibrozisin Histolojik Değerlendirmesi	29

İmmünohistokimyasal Düz Kas Aktin (SMA) Boyaması ile Değerlendirme	30
BİYOKİMYASAL ANALİZLER	30
Doku Homojenatının Hazırlanması	30
IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α Analizleri.....	31
Total Antioksidan Kapasite (TAS)	31
Total Oksidan Kapasite (TOS)	32
Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması.....	32
Lipid Peroksidasyon Ölçümü.....	32
İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	33
BULGULAR	34
KİLO ALIMI	34
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	35
Alveol Yüzey Alanının Değerlendirilmesi.....	35
Fibrozisin Değerlendirilmesi.....	36
SMA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	37
BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI	41
Proinflamatuvar Sitokin Düzeyleri	41
IL-10 Düzeyleri.....	43
TARTIŞMA	46
SONUÇLAR	58
KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

BPD	: Bronkopulmoner displazi
ET	: Endotelin
FİCS	: Fetal inflamatuvar cevap sendromu
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HAH	: Hiperoksik akciğer hasarı
H&E	: Hematoksilen&Eosin
haPDA	: Hemodinamik anlamlı PDA
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL-10	: İnterlökin-10
İP	: İntraperitoneal
IPPV	: İntermittan pozitif basınçlı ventilasyon
İUGG	: İntrauterin gelişme geriliği
MDA	: Malondialdehid
MMP	: Matriks metalloproteinaz
nCPAP	: Nazal sürekli pozitif havayolu basıncı
NICHD	: Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
NIH	: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NO	: Nitrik oksit
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PBV	: Pozitif basınçlı ventilasyon
PDA	: Patent duktus arteriozus
PH	: Pulmoner Hipertansiyon
PM	: Postmenstrüel
RBP	: Retinol-binding protein
RDS	: Respiratuvar distress sendromu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SMA	: Düz kas aktin

SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: <i>Statistical package for the social sciences</i>
TAS	: Total antioksidan kapasite
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
TOS	: Total oksidan kapasite
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VILI	: Ventilatör ile indüklenen akciğer hasarı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1	Akciğer gelişiminin sakküler evresinde antenatal akciğer hasarına maruz kalma.....	6
Şekil 2	Bronkopulmoner displazi gelişim süreci.....	9
Şekil 3	Deney düzeneği.....	28
Şekil 4	Dekapitasyon sonrası, torakotomi ve akciğer dokusunun çıkarılması	28
Şekil 5	Grupların deney sonrası ağırlık dağılımı.....	35
Şekil 6	Alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri.....	38
Şekil 7	Fibrozisin değerlendirildiği akciğer kesitleri.....	39
Şekil 8	SMA ekspresyonunun değerlendirildiği akciğer kesitleri.....	40
Şekil 9	Grupların akciğer dokusu TNF- α düzeylerinin dağılımı	42
Şekil 10	Grupların akciğer dokusu IL-6 düzeylerinin dağılımı	42
Şekil 11	Grupların akciğer dokusu IL1- β düzeylerinin dağılımı	43
Şekil 12	Grupların akciğer dokusu IL-10 düzeylerinin dağılımı	44
Şekil 13	Grupların akciğer dokusu TAS düzeylerinin dağılımı	45
Şekil 14	Grupların akciğer dokusu TOS düzeylerinin dağılımı	46
Şekil 15	Grupların akciğer dokusu MDA düzeylerinin dağılımı	46

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Bronkopulmoner displazi tanımı ve sınıflaması.....	3
Tablo 2 Akciğerlerin fetal ve embriyonel gelişim evreleri	6
Tablo 3 Eski ve yeni BPD patolojisindeki değişiklikler.....	7
Tablo 4 BPD gelişiminde başlıca etkenler	9
Tablo 5 Deney gruplarının deney öncesi ve sonrası ortanca ağırlıkları ve karşılaştırılması	34
Tablo 6 Deney gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması	36
Tablo 7 Deney gruplarının akciğer fibrozis skorları ve karşılaştırılması	37
Tablo 8 Deney gruplarının akciğer SMA skorları ve karşılaştırılması	37
Tablo 9 Deney gruplarının akciğer dokusu proinflatuar sitokin düzeyleri ve karşılaştırılması	41
Tablo 10 Deney gruplarının akciğer dokusu IL-10 düzeyleri ve karşılaştırılması	43
Tablo 11 Deney gruplarının akciğer dokusu oksidan stres belirteci düzeyleri ve MDA karşılaştırılması	45

ÖZET

Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda bosentanın akciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri

Dr. Özgün TABAN

Bronkopulmoner displazi (BPD) prematüre bebeklerde önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Çalışmamızda nonspesifik bir endotelin reseptör antagonisti olan, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri bilinen bosentanın, hiperoksik akciğer hasarı (HAH) oluşturulan ratlarda akciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı. Postnatal üçüncü günde başlayıp 13. güne kadar devam eden deneyde rat yavruları randomize olarak altı gruba ayrıldı. Grup 1 (oda havası, kontrol grubu, n=6), Grup 2 (HAH, n=8), Grup 3 (bosentan, n=7), Grup 4 (HAH+salin, n=7), Grup 5 (HAH+erken bosentan, erken bosentan tedavi grubu, n=6) ve Grup 6 (HAH+ geç bosentan, geç bosentan tedavi grubu, n=7). HAH için ratlar postnatal 3-13. günlerde plexiglastan imal edilen kapalı alanda hiperoksiye (O₂ konsantrasyonu %90±2) maruz bırakıldı. Bosentan 30 mg/kg/gün intraperitoneal (İP) tek dozda uygulandı. Postnatal 14. günde tüm ratlar dekapite edildi. Histopatolojik değerlendirmede; alveol yüzey alanı, fibrozis ve düz kas aktin "SMA" skoru için sağ akciğer dokusu, biyokimyasal değerlendirmede interlökin-1β (IL-1β), IL-6, IL-10, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α), malondialdehid (MDA), total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS) için sol akciğer dokusu kullanıldı. Çalışma sonunda histopatolojik incelemede alveolar yüzey alanı, fibrozis ve SMA skor düzeyi HAH gruplarında (Grup 2 ve 4) kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı (p<0.01). HAH grubuyla karşılaştırıldığında, geç bosentan tedavi grubunda bosentan tüm histopatolojik skorları anlamlı oranda azaltırken, erken bosentan tedavi grubunda sadece SMA skorunu azalttı (p<0.01). İlâveten HAH grubuyla karşılaştırıldığında, bosentanın hem erken hem de geç tedavi grubunda IL-6 ve TNF-α düzeylerini belirgin azalttığı saptandı (p<0.01). Bosentanın Grup 2 ve 4'e kıyasla Grup 3'te TAS düzeyini anlamlı arttırdığı görülse de erken ve/veya geç tedavi gruplarında anlamlı bir değişiklik bulunmadı. TOS ve MDA düzeyleri bakımından da erken ve/veya geç bosentanın etkisi görülmedi. Sonuç olarak bu deneysel çalışmada HAH geliştirilen ratlarda bosentanın IL-6 ve TNF-α düzeylerini azalttığı, hiperoksik akciğer hasarında belirgin histopatolojik düzelme sağladığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Hiperoksik akciğer hasarı, bosentan, tedavi.

SUMMARY

Histopathological and biochemical effects of bosentan on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats

Dr. Özgün TABAN

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) remains to be an important cause of morbidity and mortality in premature infants. Currently, there is no proven effective treatment modality for BPD. In our study, the histopathological and biochemical effects of bosentan, which is a non-specific endothelin receptor antagonist and known antioxidant and anti-inflammatory properties, on hyperoxia-induced lung injury (HLI) of rat-pups were investigated. The experiment was performed on newborn rat-pups from 3rd day to 13th postnatal days. They were randomly divided into six groups. Group 1 (room air, control group, n=6); Group 2 (HLI, n=8); Group 3 (bosentan, n=7); Group 4 (HLI+saline, n=7); Group 5 (HLI+early bosentan, early treatment group, n=6) and Group 6 (HLI+late bosentan, late treatment group, n=7). For HLI, the rats were exposed to hyperoxia (O₂ concentration 90%±2) between the postnatal 3rd day and 13th days in a closed space produced from plexiglass. Bosentan was administered intraperitoneally with a dose of 30 mg/kg/day. All of the rats were decapitated on the postnatal 14th day. On the histopathological evaluation, the right lung tissue was used for alveolar surface area, fibrosis, and smooth muscle actin "SMA" score. On the biochemical evaluation, the left lung tissue was used for interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC), and total oxidant capacity (TOC). At the end of the study, the histopathological examination revealed that the alveolar surface area, fibrosis and SMA score were significantly higher in the HLI groups (Group 2 and 4) (p<0.01). Compared with HLI groups, bosentan, in late treatment group, reduced all of histopathological scores, whereas bosentan, in early treatment group, reduced only SMA score (p<0.01). In addition that bosentan was reduced the levels of IL-6 and TNF- α in the both of treatment groups compared with the HLI group (p<0.01). Although bosentan significantly increased TAC level in the Group 3 compared to Groups 2 and 4, no significantly differences were found in the early or/and late bosentan treatment groups. Bosentan had no effects on TOC and MDA levels in the early and/or late treatment groups. In conclusion, this experimental study, demonstrated that bosentan reduced IL-6 and TNF- α levels and provided a significantly histopathological improvement in rat pups exposed to hyperoxic induced lung injury.

Keywords: Hyperoxic lung injury, bosentan, treatment.

GİRİŞ VE AMAÇ

Bronkopolmoner displazi (BPD), ilk kez 50 yıl önce Northway ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve o dönemde, respiratuar distres sendromu (RDS) nedeniyle entübe edilerek konvansiyonel ventilasyon desteği almış, görece büyük prematüre bebeklerin fibrozisle karakterize kronik akciğer hastalığı olarak tanımlanmıştır (1). BPD'nin epidemiyolojisi, ortaya çıkış şekli, kliniği, radyolojik ve patolojik bulguları zamanla değişim göstermiştir (2). Günümüzde ise gebelik yaşı çok daha düşük prematüre bebeklerde alveoler ve pulmoner vasküler gelişiminin erken doğum ve devamındaki süreçlerden olumsuz etkilenmesi sonucu ortaya çıkan "yeni BPD" olarak ele alınmaktadır (3).

Bronkopolmoner displazi etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir, ancak BPD gelişiminde antenatal, natal ve postnatal dönemde ortaya çıkan birçok risk faktörü rol oynamaktadır. Bu risk faktörlerinin bir kısmı önlenemez olmakla beraber immatürite, baro/volütravma, oksidan stres, intrauterin başlangıcı da olabilen infeksiyon/inflamasyon ve proteolitik zedelenme mekanizmaları ve bazı antenatal faktörler de BPD gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (4).

Bronkopolmoner displazi gelişimini tümüyle önleyen bir yöntem bulunmamakla birlikte; prematüre doğumların engellenmesi, prenatal steroid uygulanması, postnatal dönemde sürfaktan, antiinflamatuvar ajanlar, antioksidan tedaviler ve yeni non-invazif mekanik ventilasyon stratejileri ile hastalık şiddeti azaltılabilir (5).

BPD patogeneğinde inflamatuvar yanıt oldukça önemli yer tutmaktadır. İnflamatuvar yanıtta en erken oluşan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin 1-beta (IL-1 β) ve IL-6 salınımını uyarmaktadır. Antiinflamatuvar etkili IL-10 ise proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltmaktadır. Yetersiz antiinflamatuvar yanıtın BPD için risk faktörü olduğu düşünülmektedir.

BPD'nin günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Çalışmalarda nonspesifik bir endotelin reseptör antagonisti olan, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri bilinen bosentanın, proinflamatuvar sitokinler IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerini azalttığı (6) antiinflamatuvar etkili IL-10 düzeyini arttırdığı (7), oksidatif stres belirteci malondialdehid (MDA) seviyesini azalttığı (8) gösterilmiştir.

Ancak, literatürde bosentanın hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda etkinliğini değerlendiren bir çalışmaya rastlayamadık.

Bu amaçla, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri bilinen bosentanın, hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda erken ve geç tedavi etkilerini biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirmek istedik.

GENEL BİLGİLER

BRONKOPULMONER DİSPLAZİ

TANIM

Bronkopulmoner displazi, ilk kez 50 yıl önce Northway ve arkadaşları tarafından uzun süre mekanik ventilasyon ve yüksek konsantrasyonda oksijen ile tedavi edilmiş ağır RDS'li prematüre bebeklerde görülen klinik, radyolojik ve patolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır (1). BPD'nin ilk tanımlandığı yıllardan sonra, günümüzde teknolojinin gelişmesi ve tıp alanındaki yeniliklerle birlikte doğum ağırlığı ve gebelik yaşı çok düşük prematüre bebekler yaşamaya başlamış ve bunlarda görülen kronik solunum yetmezliği "yeni BPD" olarak tanımlanmıştır (9).

Günümüzde yaygın olarak kabul edilen tanımlama ve sınıflandırma sistemi Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından geliştirilen ve 2001 yılında yayımlanan kriterlere dayanmaktadır (Tablo 1). Bu kriterlere göre BPD, en az 28 gün oksijen ihtiyacı olan bebeklerde 36. haftada oksijen desteğinin devam etmesi olarak tanımlanmıştır. BPD, oksijen ve/veya solunum desteği düzeyine göre hafif, orta ve ağır şeklinde sınıflandırılmıştır (9).

Tablo 1: Bronkopulmoner displazi tanımı ve sınıflaması (3)

	Gebelik Yaşı < 32 hafta	Gebelik Yaşı ≥ 32 hafta
Değerlendirme	Postmenstrüel (PM) 36. haftada veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense)	> 28.gün - < 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense)
Hafif BPD	En az 28 gün ≥ 21 O ₂ gereksinimi + PM 36. haftada veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>Ek O₂ gereksiniminin olmaması</u>	En az 28 gün ≥ 21 O ₂ gereksinimi + postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>Ek O₂ gereksiniminin olmaması</u>
Orta BPD	PM 36. hafta veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>< %30 ek O₂ gereksiniminin olması</u>	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>< %30 ek O₂ gereksiniminin olması</u>
Ağır BPD	PM 36. hafta veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>≥ 30 O₂ gereksinimi ve /veya pozitif basınç (PBV veya nCPAP) gereksinimi</u>	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <u>≥ 30 O₂ gereksinimi ve /veya pozitif basınç (PBV veya nCPAP) gereksinimi</u>

PBV: Pozitif basınçlı ventilasyon, PM: Postmenstrüel, nCPAP: Nazal sürekli pozitif hava yolu basıncı.

Tarihçe

Klasik BPD ilk kez Northway ve arkadaşları (1) tarafından 1967 yılında, gebelik yaşları 30-37. hafta olan RDS nedeniyle yüksek konsantrasyonda oksijen ve yüksek basınçlı mekanik ventilasyonla tedavi edilen prematüre bebeklerde klinik, radyolojik ve patolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır.

Pusey ve arkadaşları (4) 1969 yılında RDS olmayan yenidoğanlarda uzamış mekanik ventilasyon ile ilişkili olarak gelişen yaygın interstisyel 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.

Bancalari ve ark. 1979 yılında, en az üç gün mekanik ventilasyon ihtiyacı ve 28 günden uzun süre oksijen ihtiyacı devam eden bebeklerde solunum eforunda artış ve akciğerde radyolojik bulgularla seyreden solunum yetmezliği olarak BPD'yi yeniden tanımlamıştır (2). E. Bancalari ve A.H. Jobe tarafından, prematüre bir bebekte yaşamın ilk haftası ile BPD tanısının konulacağı zaman arasında geçen yaklaşık üç haftalık süreçte solunum sıkıntısı ve solunum desteği gereksiniminin devam ettiği belirtilmiş ve bu süreç için yeni bir tanımlama önerilmiştir. E. Bancalari ve A.H. Jobe, bu süreçte solunum desteği gereksiniminin sepsis, patent duktus arteriozus (PDA), apne, hava yolu obstrüksiyonu gibi risk faktörlerine bağlı olabileceğini belirtmişler ve bu durumun “prematürenin solunumsal instabilitesi” olarak tanımlanmasını önermişlerdir (10).

Neonatoloji alanındaki teknolojik gelişmeler, antenatal steroid uygulamaları, sürfaktanın kullanıma girmesi, modern ve daha az travmatize edici ventilasyon tekniklerinin kullanılması ile BPD'nin ortaya çıkış şekli değişmiştir.

Görülme Sıklığı

Son yıllarda daha nazik ve non-invaziv ventilatör teknikleri, antenatal steroid kullanımı ve minimal invaziv sürfaktan verilmesi ile prematüre bebeklerde akciğer zedelenmesi riski azalmıştır. Diğer taraftan aşırı derecede prematüre bebeklerin yaşama şansı artmıştır. Bu nedenle BPD görülme sıklığı değişmemiş hatta prematüre

doğumların en sık görülen geç morbiditesi olarak önemini korumaya devam etmektedir.

BPD insidansı gebelik yaşı ve doğum ağırlığı ile ters orantılıdır. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde kullanılan BPD tanımına göre BPD sıklığının da farklı olduğu görülmektedir.

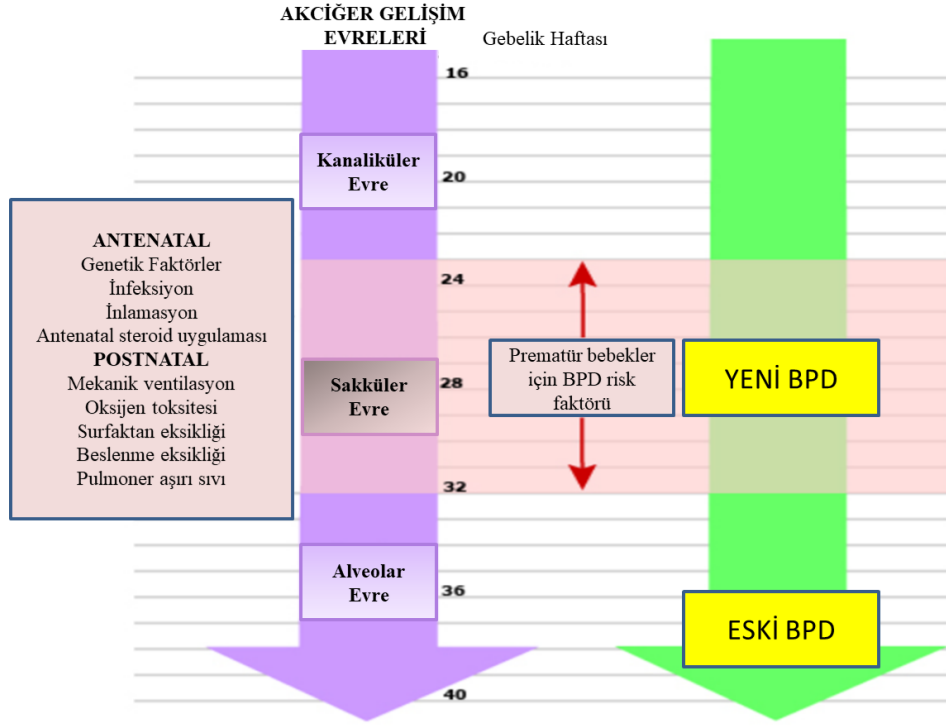
Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü (NICHD) tarafından 1993-1994 yılları arasında prematürelde 36.haftada oksijen gereksinimine göre tanımlanan BPD sıklığı yaklaşık %19 olarak rapor edilirken; 1995-1996 yıllarını kapsayan dönemde araştırmalar 1500 gr'dan daha küçük prematürelde BPD sıklığını %23 olarak rapor etmiştir (11,12). NICHD'ye göre BPD sıklığı, doğum ağırlığı 501-750 gr bebeklerde %52, 751-1000 gr bebeklerde %34, 1001-1200 gr bebeklerde %15 ve 1201-1500 gr bebeklerde %7 olarak bildirilmiştir (12).

Kanada merkezli retrospektif çok merkezli bir araştırmada, 1996 ile 1997 ve 2006 ile 2007 yılları arasında doğan bebeklerde mortalitede bir azalma gözlenirken BPD insidansında bir artış olduğu bildirilmektedir (13). Bunun aksine, Birleşik Devletler ulusal veri tabanını kullanan ve 1993-2006 yılları arasını kapsayan bir çalışmada ise BPD oranında yılda %4.3'lük bir düşüş olduğu bildirilmektedir (14). BPD sıklığındaki bu azalmanın prematüre doğumların önlenmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Patofizyoloji

Normal Akciğer Gelişimi

Prenatal akciğer gelişimi beş evrede gerçekleşir ve postnatal dönemde de devam eder (Tablo 2). Akciğerlerin fetal ve embriyonal gelişim evreleri şekil-1'de belirtilmektedir. Akciğerler gebeliğin 23-32. haftalarında gelişimin sakküler evresi boyunca hasarlara karşı çok daha fazla duyarlıdır. Bu evrede prematüre akciğerinde, havayolu destek yapılarında zayıflık, sürfaktan eksikliği, azalmış kompliyans, antioksidan mekanizmalar ve sıvı klirensinde yetersizlik görülür (15).



Şekil 1. Akciğer gelişiminin sakküler evresinde antenatal akciğer hasarına maruz kalma, pulmoner gelişimde durma veya gecikme "yeni" BPD, postnatal yapısal pulmoner hasar "eski" BPD (15).

Tablo 2. Akciğerlerin fetal ve embriyonal gelişim evreleri (16)

Embriyonel evre (konsepsiyon sonrası 26. gün ile 7. hafta)
Hava yolları bronkopulmoner segmentlere kadar uzanır
Psödoglandüler evre (7. ile 16. hafta)
Asinüslara kadar 16-25 jenerasyon ikili hava yolları bölünmüş olur
Respiratuvar epitel ve kıkırdak farklılaşır
Preasiner vasküler yapının damarsal gelişimi tamamlanır
Kanaliküler evre (16. ile 26-28. hafta)
Uç epitelyum hücreleri kübik yapı alır (bronş epitelinden farklı)
Tip 2 epitel hücrelerinin farklılaşması başlar
20. haftada distal pulmoner sirkülasyon gelişir
İnterstisiyel doku azalır (geleceğin alveolar üniteleri incelir)
Sakküler evre (26-28 ile 32-36 hafta)
Sakküler duvarların interstisiyel boşlukları belirgin azalır
Sekonder krestler (alveollerin progenitörleri) silendirik sakküler bölünme
Bu krestler iki katlı kapiller tabaka içerir
Alveolar evre (32-36. hafta ile postnatal 2 yaş)
Asiner yapı kompleksleşir, kapillerler ile birleşerek alveolleri oluşturur

Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patolojisi

Antenatal ve postnatal dönemde uygulanan yeni tedaviler ile birlikte bronkopulmoner displazili hastaların otopsilerindeki akciğer patolojik bulguları değişiklik göstermiştir (16) (Tablo 3).

Etkili bir gaz değişimi için, akciğer yüzey alanı yani alveol sayısının, kan damarlarının artması ve alveol-kapiller bariyerin incilmesi gereklidir. Bu değişiklikler, sekonder septasyonun ve distal pulmoner mikrovasküler maturasyonun yüzey alanını arttırdığı ve aralarındaki mesafeyi en aza indirdiği evrede, yani akciğerin sakküler ve alveolar gelişim evrelerinde meydana gelir (17).

Eski BPD formu, skuamöz metaplazi gibi ağır hava yolu epitel lezyonları, belirgin hava yolu düz kas hiperplazisi, yaygın fibroproliferasyon, geniş alveoler septal fibrozis ve pulmoner arterlerin hipertansif lezyonları, alveol ve iç yüzey alanında azalma ile karakterizedir. Yeni BPD ise alveolar hipoplazi ve asiner komplekste azalma, vasküler yatakta azalma ve dismorfizm, değişken intersitisyel fibroproliferasyon, daha hafif arteriyel ve arteriolar vasküler lezyonlar ve değişken oranlarda hava yolu düz kas hiperplazisi ile karakterizedir (18).

Tablo 3. Eski ve yeni BPD patolojisindeki değişiklikler (16)

Eski Bronkopulmoner Displazi Patolojisi	Yeni Bronkopulmoner Displazi Patolojisi
<ul style="list-style-type: none">• Değişken atelektazi ve aşırı havalanma alanları• Havayolu epitelinde şiddetli hiperplazi, skuamöz metaplazi• Hava yolu düz kas hiperplazisi• Aşırı fibroproliferasyon• Belirgin vasküler lezyonlar• Alveol sayısı ve yüzey alanında azalma	<ul style="list-style-type: none">• Alveolar hipoplazi ve asiner komplekste azalma, kılcal damarlarda azalma, dismorfizm• Hava yolu epitel lezyonları şiddetinde azalma• Değişken derecelerde hava yolu düz kas hiperplazisi• Değişken derecede intertisyel fibroproliferasyon• Daha hafif arteriyel/arteriolar vasküler lezyonlar

Akciğer Hasarının Meydana Geliş Şekilleri

BPD'nin etiyojisi multifaktöriyel olup, gelişim sürecinde önemli etkisi olan beş ana mekanizma; inflamasyon, yapısal bozukluklar, fibroproliferasyon, gelişimin bozulması ve/veya gecikmesi ve damar gelişiminin bozulmasıdır.

1. İnflamasyon: BPD gelişen hastalarda koryoamniyonit varlığında amniyotik sıvıda ve kanda IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın arttığı gösterilmiştir (19). Antiinflamatuvar etkili IL-10, proinflamatuvar etkileri olan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 üretimini inhibe eder. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik BPD gelişiminde önemli yer tutmaktadır (20).

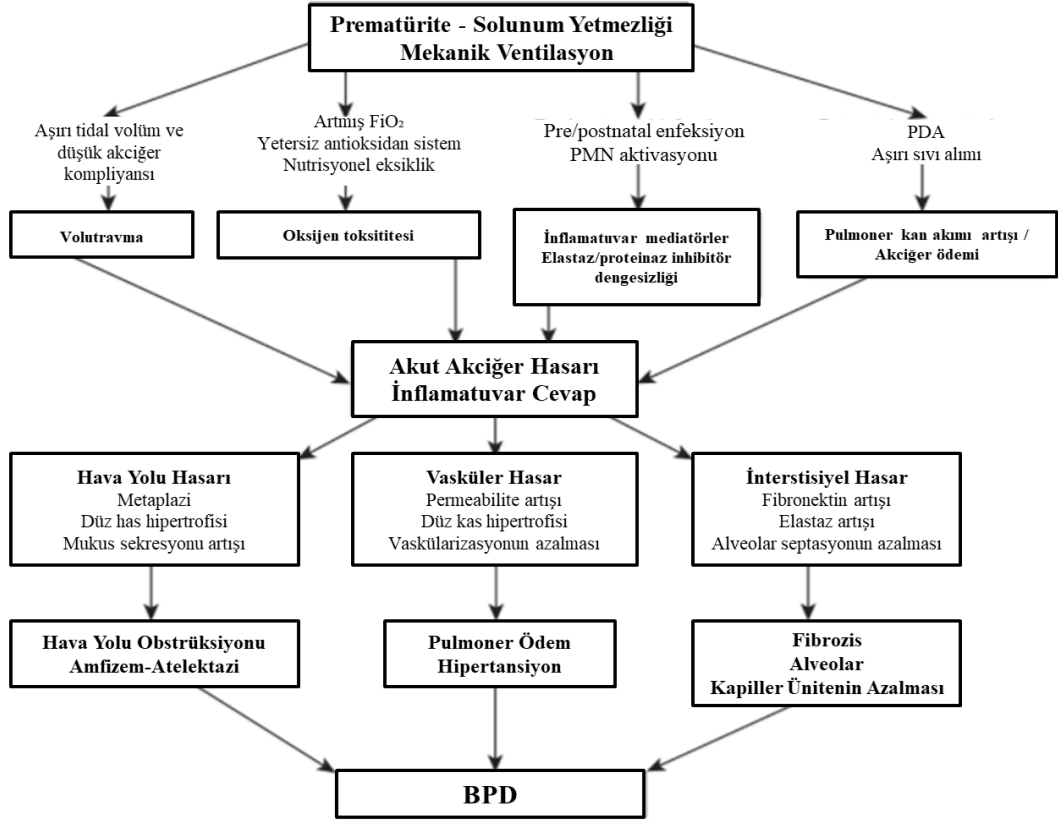
2. Yapısal bozukluklar: Kronik akciğer hasarı gelişen bebeklerin havayolu sekresyonlarında inflamatuvar hücre olarak yaşamın ilk haftasında nötrofiller ön planda iken, sonra alveolar makrafajlar ön plana geçmektedir (21). İnflamasyon sürecinde aktive hale gelen nötrofiller pulmoner vasküler sistem endoteline yapışır ve hasarı başlatır.

3. Fibroproliferasyon: Akciğer gelişiminin kanaliküler ve sakküler aşamalarında gelişen akciğer hasarı basit alveol yapısı, dismorfik kılcak yapı ve fibroproliferasyon ile sonuçlanmaktadır (22) .

4. Gelişimin bozulması/gecikmesi: Alveoler gelişimin duraklaması daha az ve daha büyük alveoler yapı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum prematüre akciğerinde alveol kaybına ve gaz değişimi için yüzey alanının azalmasına neden olmaktadır (16).

5. Damar gelişiminin bozulması: Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotelial hücre büyüme ve farklılaşmasını uyarır. Endotelden VEGF salgılanmasını inhibe eden herhangi bir pulmoner zedelenme pulmoner vasküler büyüme ve gelişmeyi bozar. Birçok BPD modelinde damar gelişiminin bozulduğu, VEGF ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (23).

Şekil 2. Bronkopulmoner Displazi Gelişim Süreci (24)



Etiyoloji/Risk Faktörleri

Bronkopulmoner displazi gelişimi doğum öncesi dönemden başlayarak, doğum sırasında ve doğumdan sonra ortaya çıkan birden fazla faktörle ilişkilidir (Tablo 4).

Tablo 4. BPD gelişiminde başlıca etkenler

ANTENATAL	NATAL	POSTNATAL
Genetik faktörler	Gebelik yaşı	Hiperoksi/oksidan stres/yetersiz antioksidan sistem
Intrauterin gelişme geriliği	Doğum ağırlığı	Mekanik ventilasyon (volu/barotravma)
Koryoamniyonit		Sepsis
Gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklar		Patent duktus arteriosus
Maternal sigara kullanımı		Solunum yolu mikrobiyatası

Antenatal

Genetik

Bronkopulmoner displazi etiyolojisinde genetik faktörlerin de rolü olduğu öne sürülmektedir. Sürfaktan protein A geni ve sürfaktan protein B geni intron 4 bölgesindeki polimorfizm ile sürfaktan protein C geni dominant mutasyonlarının BPD varlığı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (25). HLA-A2 ve ailede astım öyküsü varlığı, BPD gelişimi veya şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. Orta ve şiddetli BPD görülme sıklığı, tek yumurta ikizlerinde aynı özelliğe sahip olmayan ikizlerle karşılaştırıldığında belirgin olarak daha yüksek, buna karşın hafif BPD görülme sıklığı her iki grupta da benzer saptanmıştır (26). Bu çalışmalar, genetik yatkınlığın orta ve ağır BPD'nin patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Intrauterin Gelişme Geriliği (IUGG)

Intrauterin gelişme geriliği BPD gelişme riskini arttırmaktadır. Plasenin fonksiyon bozukluğu, insülin büyüme faktörü eksikliği, VEGF ve VEGF reseptör eksikliği gibi mekanizmaların fetal akciğer büyümesini kısıtlayabileceği düşünülmektedir (27).

Koriyoamniyonit

Koriyoamniyonit ile BPD gelişimi ilişkilendirilmekle birlikte, tam olarak kanıtlanamamıştır. Koriyoamniyonit varlığının antenatal dönemde inflamatuvar cevabı başlatarak BPD gelişimine yol açabileceği ileri sürülmüştür (28). Ballard ve arkadaşları koriyoamniyonit veya sepsis ile BPD ilişkisini araştırdıkları (1989-1994) çalışmada yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan gebelik yaşı ≤ 32 hafta olan 1686 çok düşük doğum ağırlıklı bebeğin %44'ünde (740 bebek) orta ve ağır BPD saptamışlar, BPD'nin sepsis ile ilişkili olduğunu ancak koriyoamniyonit ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (29).

Özellikle koriyoamniyonit varlığında, bol miktarda sitokin salınması ile karşılaşan akciğerlerde, postnatal resüsitasyon, mekanik ventilasyon veya oksijen tedavileri de eklenirse, akciğer zedelenmesi, pulmoner inflamatuvar cevap, anormal

yara iyileşmesi, fibrozis ve sonuçta alveolarizasyon ve vasküler gelişimin inhibisyonu ile karakterli BPD tablosu oluşabilir. BPD gelişen hastalarda koriyoamniyonit varlığında amniyotik sıvıda ve kanda IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF-alfa gibi proinflamatuvar mediatörlerin arttığı gösterilmiştir (19). Koriyoamniyonit ile ilişkili olan *ureaplasma urealyticum* başta olmak üzere havayolunun infeksiyöz ajanlarla kolonizasyonun BPD riskini arttırabileceği bildirilmektedir (30).

Gebeliğe Bağlı Hipertansif Hastalıklar

Gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi ve eklampsi de dahil olmak üzere gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklarda salınan proinflamatuvar ve anti-anjiyojenik mediatörlerin, pulmoner anjiyogenezisi etkileyerek akciğer gelişimini kesintiye uğratabileceği bildirilmektedir (31). Bununla birlikte, gebe kadınlarda bu hipertansif bozuklukları BPD gelişimiyle ilişkilendiren kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Geniş kapsamlı bir kohort çalışmada, gebelik yaşı 22-31 hafta olan 2697 prematüre bebekte İUGG ve gebeliğe bağlı hipertansif hastalık birlikteliğinde orta ve ağır BPD görülme sıklığı, sadece gebeliğe bağlı hipertansif hastalık varlığına göre daha fazla bulunmuştur (32). Bose ve ark.'nın çalışmasında da (27), maternal preeklampsi ile karşılaştırıldığında, maternal preeklampsi ve İUGG birlikteliğinin BPD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmalar, İUGG yokluğunda tek başına maternal hipertansiyonun BPD gelişiminde bir risk faktörü olmayabileceğini göstermektedir.

Maternal Sigara Kullanımı

Birçok araştırmacı annenin sigara içmesi ile BPD arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmıştır. İtalya, Almanya ve Kanada'daki nüfusa dayalı kohort çalışmaları, gebelik sırasında sigara içen anneden doğan preterm bebeklerde BPD gelişme riskinin arttığını göstermiştir (33). Sigara dumanına maruziyet ile akciğer gelişiminin ve fonksiyonunun bozulmasında epigenetik değişiklikler, alveolar tip II hücre metabolizma bozukluğu ve disregüle anjiyogenez sorumlu tutulmaktadır (34).

Natal

Prematürite ve Doğum Ağırlığı

BPD gelişiminde prematüre doğum en önemli etiyolojik faktördür. Embriyonal dönemde ön bağırsak endodermal hücrelerinden akciğer tomurcuklarının oluşması “*transcription factor / hepatocyte nuclear factor-3β*” kontrolündedir. Bu dönemde alveolar epitelyal hücrelerden salgılanan mitojenik peptid olan VEGF vasküler yapılanmayı stimüle eder, endotelial hücre büyüme ve farklılaşmasını uyarır. Endotelden VEGF salgılanmasını inhibe eden herhangi bir pulmoner zedelenme pulmoner vasküler büyüme ve gelişmeyi bozar. “Transforme edici büyüme faktörü-beta” (TGF-β) akciğer morfogenezinde inhibitör etkiye sahiptir (35). Prenatal akciğer gelişimi beş dönemde gerçekleşir ve postnatal dönemde de devam eden bir süreçtir. Kanaliküler dönem (26-28 gebelik haftası) kritik önem taşımaktadır. Kanaliküler evre ve öncesinde hipoksiye maruz kalmak veya bebeğin doğması, akciğerlerde respiratuar bronşiooller ve alveoler duktusların gelişimini etkileyeceği için alveol sayısı azalacaktır, bu da bebeklerde akciğer hipoplazisi benzeri bir durum oluşturacaktır. Sakküler evre (terminal kese evresi) ve daha sonra oluşan akciğer hasarlanmasında ise alveol yapısı basitleşir ve alveol sayısı azalır ancak gelişen patoloji daha hafiftir (14). Örneğin 23. gebelik haftasından önce doğan bebeklerde BPD insidansı %78 olup bunların %58’inde ağır BPD saptanırken 28. gebelik haftasında doğan bebeklerde BPD insidansı %23 olup %8’inde ağır BPD bulunmuştur (36).

Postnatal

Oksijen

Oksidatif stres BPD gelişimde rol oynayan başlıca risk faktörlerinden biridir. Oksidatif stres hücre metabolizması sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Prematüre bebeklerde oksidatif stres gelişme riski, antioksidan savunmalarının immatür olması, infeksiyon ve inflamasyona duyarlı olmaları ve

serbest demir maruziyeti yüzünden yüksektir (37). Oksidatif stres, büyüme faktörü sinyali, hücre dışı matriks tamiri, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezisi kesintiye uğratan mekanizmalarla ve apoptozisle akciğer gelişimini bozar. Hiperoksiye maruziyetle oluşan ROS, hücre bileşenlerini doğrudan tahrip eden güçlü oksitleyici ajanlardır. Membran lipidlerini, yapısal proteinleri, enzimleri ve nükleik asitleri oksitleyerek hücre ölümüne ve doku hasarına neden olur. Akut hiperoksiye maruziyet sonucu başlangıçta endotel hücre hasarı ve ölüm meydana gelir, bunu alveol ödeme ve gaz değişiminde bozulmaya neden olan epitel hücre hasarı ve alveolo-kapiller damarların parçalanması izler. Oksijen, solunum yetmezliği olan pretermelerde hayat kurtarıcı bir tedavi olarak sıklıkla kullanılsa da aşırı veya uzun süreli yüksek konsantrasyonla oksijen maruziyeti, ROS üretimi ve proinflatuar sitokin ekspresyonunun artışı ile sonuçlanır (38).

Mekanik Ventilasyon

Doğumdan sonra uygulanan solunum desteği sırasında oluşan akciğer hasarı, BPD gelişiminde önemlidir. En az solunum desteği ile yeterli gaz alışverişinin sağlanması BPD'nin önlenmesindeki temel stratejidir. Bu da en iyi invazif olmayan solunum desteği ile gerçekleştirilir.

Ventilatör ile indüklenen akciğer hasarının (VILI) nedenleri barotravma, volutravma, atelektotravma ve biyotravmadır. Volutravma VILI'nin en önemli belirleyicisidir. Bu nedenle, entübe preterm bebeklerde akciğer hasarını önlemek için aşırı tidal hacimlerin (VT) önlenmesi önemlidir (39). Volu/barotravma akciğerlerde aşırı gerilmeye neden olur. Pulmoner damar direnci artar ve endotel hasarı oluşur. Endotel hasarı sonucu damar geçirgenliği ve ekstrasvasküler akciğer sıvısı artar. Pulmoner dolaşımda nötrofillerin birikimi artar, bu da inflammatuar mediyatörlerin salgılanmasına neden olur. Akciğer hasarına aday küçük prematürelere doğum salonundan itibaren ilk solunum desteği için nCPAP rutin kullanıma girmelidir (3).

Sepsis

Pulmoner ve sistemik infeksiyonlar, uygunsuz resüsitasyon, yüksek oksijen maruziyeti, mekanik ventilasyon, koriyoamniyonit ve çeşitli postnatal faktörler,

prematürelere immatür hava yollarında ve intertisyumunda inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (40). Birçok çalışma postnatal sepsisin bağımsız olarak BPD insidansını arttırdığını göstermektedir (41). Çalışmalar, postnatal enfeksiyonun, antenatal inflamasyona göre BPD gelişiminde daha önemli bir etken olduğunu ileri sürmektedir. Koryoamniyonit preterm doğum riskini artırır, ancak BPD gelişiminde önemli bir risk faktörü olup olmadığı tartışmalıdır.

Önemli proinflamatuvar sitokinler olan IL-8, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 BPD gelişen yenidoğanların hava yolu sekresyonlarında yüksek oranlarda saptanmıştır (42). Proinflamatuvar sitokinlerin aktivite artışı yanında antiinflamatuvar sitokin IL-10'un yetersizliğinin de BPD gelişiminde önemli bir yer tutabileceği ileri sürülmektedir (43).

Pulmoner Ödem ve Patent Duktus Arteriozus

Sıvı yüklenmesi sonucu akciğer kan akımı ve interstisyel dokuda sıvı artar, akciğer kompliyansı azalır, hava yolu direnci, mekanik ventilasyon ve oksijen ihtiyacı artar. Patent DA'dan devamlı soldan-sağa şant akciğer kanlanmasını ve ödemi dolayısıyla alveol hasarını artırır ve mekanik ventilasyon gereksinimine yol açar. PDA'dan bağımsız olarak da hayatın ilk günlerinde aşırı sıvı tedavisi uygulanan ve fizyolojik diürezisi geciken RDS'li prematürelere BPD riski belirgin olarak artmaktadır (44).

Yetersiz Beslenme

Beslenme akciğer gelişiminde ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır ve malnutrisyonun pulmoner fonksiyon üzerinde belirgin olumsuz etkileri vardır. Bunun nedenleri arasında intrauterin büyüme kısıtlılığı, yetersiz protein ve enerji alımı, solunum iş yükünün fazla olması, enflamasyon, steroid tedavisi, katabolizmanın artışı ve enteral beslenme sorunları (beslenme intoleransı, gastroözefagial reflü) sayılabilir. BPD'li preterm bebeklerde erken beslenme desteği, parenteral beslenmenin dikkatle ayarlanması ve uygun enteral beslenme seçimi ve ilerlemesi büyümeyi arttırabilir ve daha iyi nörogelişime katkıda bulunabilir (45).

Sümfaktan Eksikliği/Disfonksiyonu

Postnatal sümfaktan eksikliği veya kurtarma tedavisinin geciktirilmesi BPD'nin patogenezinde rol oynayabilir. Gebelik yaşları 23-30 hafta arasında değişen ventilatöre bağımlı 68 prematüre bebeğin yer aldığı bir çalışmada, trakeal aspiratların %75'inde yüzey geriliminin anormal derecede düşük olduğu gösterilmiştir (46). Bu örneklerde sümfaktan protein A, B ve C'nin sırasıyla % 50, % 80 ve % 72 oranında azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar devamlı mekanik ventilatör desteğine ihtiyaç duyan prematüre bebeklerde geçici sümfaktan disfonksiyonu veya eksikliğinin gelişbildiğini ve bunun da klinik durumlarını etkileyebildiğini göstermektedir.

Adrenal Yetmezlik

Yaşamın ilk haftasında kortizol düzeyleri düşük olan bebeklerde PDA insidansında, akciğer inflamasyonunda ve kronik akciğer hastalığı insidansında artış saptanmıştır (47).

Klinik Bulgular ve Prognoz

BPD tanısı klinik ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır, ancak spesifik değildir. BPD öyküsü olan çocuklarda akciğer fonksiyon testlerinde hava akımı kısıtlılığı ile önemli anormallikler görölmektedir. On bir yıllık bir takip çalışmasında, prematüre bebekler, özellikle BPD olanlarda, akciğer fonksiyonlarında bozulma ve respiratuar morbiditede artışın devam ettiği saptanmıştır (48). Genel olarak, birçok alışma BPD'nin bebeklik döneminde solunum fonksiyonlarını bozmakla kalmayıp, aynı zamanda astım gelişme riskini arttırdığını ve çocukluk çağında pulmoner fonksiyonları önemli oranda etkilediğini göstermektedir (49).

BPD preterm bebeklerde nörolojik sonuçları olumsuz etkilemekte, baş çevresi düşüklüğü, serebral palsiye neden olmakta, bilişsel fonksiyonları ve dil becerisini bozmaktadır. Uzun süre pozitif basınçlı ventilasyon desteği, grade III-IV intraventriküler kanama ve postmenstrual 43 haftadan sonra taburculuğun, bozulmuş nörogelişimsel sorunlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (50).

BPD'li bebekler pulmoner hipertansiyon (PH) ve kardiyak disfonksiyon gelişimi açısından yüksek risk altındadır. BPD ve PH'li hastalarda, PH bulunmayan

BPD hastalarına kıyasla morbidite ve mortalite belirgin yüksektir. PH gelişen BPD'li bebeklerde ölüm oranı %50'ye kadar çıkmaktadır (51). BPD'li bebeklerde uzun dönem kalp fonksiyonlarını değerlendiren az sayıda çalışma vardır. Postmenstrual yaşı 36 haftalık olan orta/ağır BPD'li bebeklerin ekokardiyografik muayenesinde, %50'sine yakınında hafif BPD'lilere göre, sağ ventriküler fonksiyonlarının daha düşük olduğu bildirilmektedir (52).

Korunma

BPD tanısı postmenstrüel 36. haftada konulmaktadır. Tedavi ancak bir hastalığın tanısı konulduktan sonra kullanılacak bir kavramdır. Bu nedenle tedaviden çok korunma ön plana çıkmaktadır (3). Bronkopulmoner displazi gelişimi doğum öncesi dönem, doğum sırasında ve doğumdan sonra ortaya çıkan birden çok faktörle ilişkilidir.

Doğum Öncesi Dönem

- Prematüreliliğin önlenmesi
- Koryoamniyotin tedavisi edilmesi
- Annelerin gebelikte sigara içmemeleri ve tütün kullanmamaları konusunda bilgilendirilmesi

Doğum Odasında Yaklaşım

- Doğum salonu stabilizasyonunda erken nCPAP kullanılması

Doğum Sonrası Dönem

- Noninvaziv solunum desteği sağlanması
- Sürfaktan tedavisi
- Oksijen desteği ve uygun oksijen saturasyon hedefleri
- Patent duktus arteriyozusunun iyi yönetimi
- Uygun sıvı tedavisi ve beslenme
- Pulmoner hipertansiyonun iyi yönetimi

Solunum Desteği

Doğum odasında erken nCPAP uygulamaları veya hızlı ektübasyonla nCPAP uygulamasına geçiş BPD riskini azaltmaktadır. Bazı çalışmalar, mümkün olduğunca doğum odasında rutin CPAP veya non-invaziv intermittan pozitif basınçlı ventilasyon (IPPV) yöntemlerini kullanmak, zamanında surfaktan uygulamak, minimal invaziv uygulama modları kullanarak endotrakeal entübasyondan kaçınmak, daha nazik ventilasyon stratejileri ile ölüm veya BPD insidansında belirgin bir düşüş olduğunu ortaya koymaktadır (53). Endotrakeal tüp ile mekanik ventilasyona ihtiyaç duyulursa, mümkün olan en kısa sürede ekstübe etmek, en düşük ventilatör ayarlarını kullanmak, uygun durumlarda permissif hiperkapniyi uygulamak ve agresif ventilatör desteğinden kaçınmak akıllıca olacaktır (54).

Son yıllardaki veriler, doğum salonunda nazal IPPV uygulanmasını takiben entübasyon oranının azaldığını düşündürse de (55), nazal IPPV'yi nazal CPAP ile karşılaştıran daha önceki bir çalışmada BPD insidansında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (56). Mekanik ventilasyonda volüm hedefli modların tercih edilmesi BPD sıklığını azaltmaktadır (57).

Sürfaktan Tedavisi

Erken sürfaktan tedavisi, kısa süreli konvansiyonel ventilasyon ve CPAP ile solunum desteğinin devam etmesinin BPD'yi önlediğine veya azalttığına dair sonuçlar tartışmalıdır. Randomize kontrollü bir çalışmada gebelik yaşı ≤ 28 hafta olan, 7- 14 günde mekanik ventilasyon ihtiyacı devam eden inhale nitrik oksit tedavisi alan bebeklere entübasyon sırasında toplam 5 doza kadar sürfaktan tedavisi (calfactant/infasurf) verilmiş. Bu tedavinin postmenstrüel 36-40. haftalarda BPD'yi azaltamadığı gösterilmiştir (58).

Oksijen Desteği ve Oksijen Satürasyon Hedefleri

Ventilasyon-perfüzyon dengesizliğine bağlı gelişen alveolar hipoksemi BPD gelişimine katkı sağlamaktadır. Akciğerin perivasküler alanlarındaki oksijen seviyesinin azalması, akciğer damar direncinde geri dönüşümsüz hasara ve akciğer

vasküler gelişiminin bozulmasına neden olmaktadır. Komplikasyonlar tedavi edilmezse, pulmoner hipertansiyon ve kor pulmonale ile sonuçlanmaktadır (59).

Gebelik yaşı 28 haftadan küçük bebeklerde doğumdan sonra en uygun SpO₂ hedefini açıklığa kavuşturmayı amaçlayan beş büyük çalışmanın meta analizi SpO₂'nin %85–89 arasında tutulmasının tedavi gerektiren ROP sıklığını azaltmasına rağmen, mortaliteyi ve nekrotizan enterokolit sıklığını belirgin olarak arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, düşük ve yüksek (%91–95) oksijen saturasyon hedef grupları arasında ölüm veya sakatlık açısından önemli bir farklılık saptanmamıştır (60).

Ek oksijen gereksinimi olan prematüre bebeklerde hedef oksijen saturasyon aralığının %90-95 olması, hedef aralığında kalabilmek için monitor alarm limitlerinin %89-95 olarak ayarlanması önerilmektedir (3).

Patent Duktus Arteriyozus (PDA) Yönetimi

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaklaşık %65'inde haPDA saptanmakta, postnatal birinci haftadan sonra haPDA'nın BPD riskini arttırdığı bilinmektedir. BPD riskinin artması, pulmoner ödem ve sistemik yataktan pulmoner yatağa kan akımının artmasına bağlı mekanik ventilasyon süresinin uzaması ile açıklanabilir (44). Buna rağmen haPDA'yı etkili şekilde ve erken tedavi etme çabaları BPD sıklığında azalmaya neden olmamıştır (61).

Sıvı Tedavisi ve Beslenme

Malnütrisyon, akciğer büyümesini, matürasyonunu ve tamir mekanizmalarını olumsuz etkilemektedir. Bunun nedenleri arasında intrauterin büyüme kısıtlılığı, yetersiz protein ve enerji alımı, solunum iş yükünün fazla olması, inflamasyon, steroid tedavisi, katabolizmanın artması ve beslenme intoleransı, gastroözofajial reflü gibi enteral beslenme sorunları sayılabilir (45).

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde yaşamın ilk haftalarında sıvı dengesi çok önemlidir ve bu dönemde dehidratasyona veya sıvı yüklenmesine yol açmayacak bir sıvı dengesinin sağlanması gerekir. Prematüre bebeklerde en uygun sıvı alımının dehidratasyona yol açmadan fizyolojik gereksinimleri karşılayacak şekilde dikkatli

bir sıvı ayarlaması önerilmektedir ve bu yaklaşımla PDA ile beraber nekrotizan enterokolit riskinde de azalma olacağı belirtilmektedir (62).

İlaç Tedavileri

1. Metilksantinler (Kafein): Metilksantinler adenozin reseptörleri A1 ve A2'yi non-spesifik olarak inhibe ederek etki göstermektedir. Aminofilin, teofilin ve kafein gibi metilksantinler uzun süredir prematüre apnesi tedavisinde kullanılmaktadır (63). Prematüre bebeklerde kafein sitrat tedavisinin BPD sıklığını azalttığına dair bir meta-analiz bulunmasa da BPD'nin önlenmesinde etkili olabilir denilmekte ancak mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

2. Postnatal Sistemik Steroid Tedavisi: BPD'nin etiopatogenezinde en önemli unsur inflamasyondur. Kortikosteroidler, güçlü antiinflamatuvar etkileri nedeniyle bronkopulmoner displazinin önlenmesi ve tedavisi için uzun yıllar kullanılmış ve halen belli şartlarda kullanılması önerilmektedir.

a) Erken (ilk 7 gün içinde) sistemik steroid tedavisi: Yaşamın ilk yedi günü içinde sistemik deksametazon ve hidrokortizon kullanımıyla ilgili randomize kontrollü çalışmaları değerlendiren bir Cochrane meta-analizi bulunmaktadır (64). Erken sistemik deksametazon tedavisi ekstübasyonu kolaylaştırmakta, mekanik ventilatördeki kalış süresini kısaltmakta ve BPD'yi azaltmaktadır. Fakat kısa dönemde gastrointestinal perforasyon, uzun dönemde serebral palsi gibi olumsuz yan etkileri nedeniyle kullanımı önerilmemektedir (65). Parenteral uygulanan sistemik hidrokortizonun önemli bir akut yan etki oluşturmaksızın PM 36. haftada BPD'yi ve BPD/mortaliteyi azaltması ve düzeltilmiş 22. ayda nörogelişimsel sonuçları olumlu etkilemesi nedeniyle, erken düşük doz sistemik hidrokortizon kullanımı konusunda umut doğmuştur. Ancak önerilmesi için daha fazla sayıda klinik çalışmaya gereksinim vardır. Şu anki bilgiler ışığında BPD'yi önlemek için erken sistemik kortikosteroid tedavisi önerilmemektedir.

b) Geç (>7 gün) sistemik steroid tedavisi: Geç sistemik kortikosteroid tedavisi ile ilgili randomize kontrollü çalışmalarda deksametazon kullanılmıştır. Geç sistemik deksametazon tedavisi PM 36. haftada BPD, BPD/mortalite sıklığı ve PDA tedavi gereksinimini azaltırken, hiperglisemi, hipertansiyon ve hipertrofik kardiyomyopatiye neden olmaktadır (66). Uzun dönem nörogelişimsel yan etkileri erken tedavideki kadar olumsuz değildir (65). Geç sistemik deksametazon tedavisinin, akut ciddi yan etkileri göz önüne alınarak, en az iki hafta süreyle >%40 FiO₂ ile ventilatörde izlenen geç neonatal sepsis, PDA, intraventriküler kanama olmadığı gösterilen ekstübasyon olasılığı çok düşük olan ve “ağır” BPD prematürelde, ekstübasyon için mümkün olan en düşük kümülatif dozda ve en kısa süreyle uygulanabileceği bildirilmektedir (3).

3. İn hale Kortikosteroid Tedavisi:

a) Erken inhale kortikosteroid tedavisi: Bassler ve arkadaşlarının çalışmasında, gebelik yaşı 23-27 hafta olan 863 prematüre bebekte, inhale yolla verilen budesonid BPD ve BPD/mortaliteyi anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Entübe olmayan ve non-invazif solunum desteği alan hastaların üçte birinde BPD/mortalitede anlamlı azalma olduğu; uygulama sırasında komplikasyonlar açısından çalışma ve kontrol grubu arasında fark bulunmadığı görülmüştür (67). İn hale kortikosteroidlerin uzun dönem güvenilirliği konusunda çok yeterli kanıt bulunmamasına karşın, erken inhale budesonidin, gebelik yaşı <28 hafta olan prematüre bebeklerde BPD’yi azaltmak için kullanılabileceği belirtilmektedir.

b) Geç inhale kortikosteroid tedavisi: Geç inhale kortikosteroidlerin BPD ve BPD/mortalite sıklığı üzerinde olumlu herhangi bir etkisi saptanmadığı için kullanımını önerilmemektedir (3).

4. Vitamin A: Vitamin A normal akciğer büyümesi, tamiri ve solunum yolu epitelinin bütünlüğünün sağlanması için gereklidir. Aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Prematüre bebeklerde vitamin A depoları ve vitamin A transport taşıyıcı protein, “*retinol-binding protein*” (*RBP*) düzeyleri düşüktür ve bu durum

BPD gelişme riski ile ilişkili bulunmuştur. Son Cochrane meta-analizinde erken ve geç yan etki yaratmaksızın BPD'yi az da olsa azaltabildiği gösterilmiştir (68). Vitamin A intramusküler uygulandığı için zordur. Oral vitamin A, emilimi zayıf ve düşük RBP düzeyleri nedeniyle önerilmemektedir. Uygun enteral uygulama çalışmaları devam etmektedir (69). Vitamin A'nın doğum ağırlığı <1000 g olan prematüre bebeklerde, doğumdan itibaren 4 hafta süreyle, haftada 3 gün, 5000 IU, intramusküler uygulanması önerilmektedir.

5. İnhalasyon Nitrik Oksit: Nitrik oksit (NO) damar tonusunu gevşetici özelliği ile sistemik kan basıncını düşürmeyen potent seçici pulmoner vazodilatatördür. Cochrane sistematik derlemesinde, iNO tedavisinin BPD'nin önlenmesinde etkili olmadığı gösterilmiştir (70). BPD ile ilişkili kanıtlanmış pulmoner hipertansiyon dışında, BPD'yi önlemek için iNO tedavisi önerilmemektedir (3).

6. Makrolid Antibiyotikler: Makrolid antibiyotikler hem antimikrobiyal hem de anti-inflamatuar etkiler için, yani IL-6 ekspresyonunun ve NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu için denenmiştir. Daha önceki çalışmalarda azitromisin tedavisi verilen düşük doğum ağırlıklı bebeklerde mekanik ventilasyon süresinin kısaldığı ancak BPD/ölüm insidansında azitromisin ve plasebo grubuna göre belirgin bir fark olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, azitromisin alan *ureaplasma* pozitif grupta BPD insidansı düşük bulunmuştur (71). Solunum yolunda "*ureaplasma*" varlığı mikrobiyolojik yöntemlerle gösterilmiş olan BPD adayları prematüre bebeklerde, makrolid antibiyotik (azitromisin) tedavisi önerilebilir.

7. Diüretikler: BPD tanısı almış preterm yenidoğanlarda genellikle böbreklerin distal tübülüne etkili olan tiazidler, potasyum tutan spironolakton gibi diüretikler ve loop diüretik furosemid kullanılmaktadır. Bu diüretikler pulmoner interstisyel sıvı oluşumunu ve pulmoner vasküler direnci azaltır, pulmoner fonksiyonları geliştirir ve mekanik ventilasyonla oksijenden ayrılmayı kolaylaştırır. Fakat uzun süreli diüretik kullanımının hiponatremi, hipokalemi, alkaloz, azotemi, hipokalsemi, hiperkalsiüri, kolelitiazis, renal taş, nefrokalsinozis ve ototoksisite gibi yan etkileri vardır. Ağır

BPD'li preterm bebeklerde pulmoner ödemin kontrolü için, çoğunlukla spironolakton ile birlikte klortiazid tedavisi, uzun süreli kullanım için en güvenli diüretik kombinasyonu olarak düşünülmektedir. Diüretik tedavinin pulmoner fonksiyonlarda kısa vadede iyileşme sağladığı, ancak ventilatör desteğinde veya tedavi süresinde önemli bir azalmaya yol açmadığı gösterilmiş; ölüm oranındaki azalma, pozitif basınçlı ventilasyon süresinde, oksijen tedavisi süresi veya hastanede kalma süresinde azalma gibi uzun vadeli faydaları gösterilememiştir (72). Yaygın olarak kullanılan diüretiklerin prematüre bebeklerde BPD'yi önlemek için rutin kullanımı önerilmemektedir (3).

8. Bronkodilatör Tedavi: Bronkodilatatörler, bronşial düz kas hücrelerinde gevşeme sağlayarak havayolu direncini azaltırlar. Salbutamol ile profilaksi, mortalite veya kronik akciğer hastalığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiş ve salbutamol nedeniyle yan etki görülmemiştir. BPD'nin önleminde salbutamol tedavisinin güvenilirliğini değerlendirmek için yeterli veri yoktur. BPD profilaksisinde veya tedavisinde salbutamol veya diğer bronkodilatör ajanların rolünü değerlendirmek için başka klinik araştırmalar gereklidir (73).

9. Gelecek İçin Umut Veren Tedaviler

a) İnositol: İnositolun BPD dahil birçok erken dönem neonatal morbiditenin sıklığını azalttığı ve umut verici bir ilaç olduğu bildirilmiştir (74).

b) Clara Hücre Proteini (rHCC10): “Clara Hücre Proteini” solunum yolu kirpiksiz epiteli tarafından salgılanan immünomodülatuar ve antiinflamatuvar özellikleri olan bir protein molekülüdür. Çok sayıda hayvan çalışması ve küçük bir pilot çalışma ile olumlu etkisi gösterilmiş (75), etkinlik ve güvenliliği için büyük bir randomize kontrollü klinik çalışma devam etmektedir.

c) Kök Hücre Tedavisi: BPD'nin önlenmesi için mezanşimal kök hücre uygulamalarına ilişkin on yıldan uzun süredir devam eden prelinik çalışmaların

sonuçları umut vericidir. Kök hücreler, gelecekte BPD için tek korunma ve tedavi aracı olacak gibi görünmektedir (76).

d) Sürfaktan'a Adsorbe Edilen Budesonidin İntratrakeal Uygulanması: FiO₂ gereksinimi %50'den fazla olan RDS'li 265 çok düşük doğum ağırlıklı prematürede ilk 4 saat içinde 100 mg/kg dozda sürfaktana adsorbe edilmiş 0.25 mg/kg dozda budesonidin, FiO₂ gereksinimi <%30 olana dek 8 saat aralarla intratrakeal uygulanmasına ilişkin randomize kontrollü bir klinik çalışma bulunmaktadır (77). Çalışmanın sonuçları BPD açısından olumlu olsa da uzun dönem sonuçları yayınlanmamıştır.

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE ANTIOKSİDANLAR

Serbest oksijen radikalleri, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküler yapılar olarak tanımlanırlar. Oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir. Oksidatif stres, hücre metabolizması sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi ROS artışı ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır (37).

Oksidatif stres ile antioksidan savunma arasında hassas bir denge vardır. Bu denge, oksidatif radikallerin aşırı üretimi veya antioksidan savunmanın yetersiz olması ile bozulabilir. Prematüre bebeklerde hem hipoksi, inflamasyon nedeniyle artan oksidatif stres hem de yetersiz antioksidan savunma sistemi, bu bebeklerde görülen oksidatif değişikliklerin temelini oluşturmaktadır (78).

Oksidatif stres etkisi ile serbest oksijen radikallerine maruz kalan hücrelerin membran yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Hiperoksi maruziyeti sonucu alveolar ve intertisyel makrofajlardan sitokin sentezi, akciğer endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlardan kemokin sentezi ve akciğere nötrofil migrasyonu oluşur. İlâveten hiperoksi ile indüklenen ROS artışıyla gelişmekte olan akciğerde onarım süreci bozulur ve sonuçta BPD gelişimine yol açar (79). Ayrıca gebeliğin geç döneminde geliştiğinden antioksidan savunma sistemi prematürlerde yetersizdir;

dolayısıyla bu bebekler hiperoksi ile indüklenen akciğer hasarına çok daha fazla hassastırlar (80).

Hücre İçi Antioksidanlar

Katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), SOD ve sitokrom oksidaz hücre içinde yer alan enzimatik antioksidanlardır. Elektron transport zincirinde oksijenin suya indirgenmesine kadar olan ara reaksiyonlarda rol almaktadırlar (81).

Membranda Bulunan Antioksidanlar

E Vitamini

E vitamini hücre membranını oksidatif hasardan koruyan bir antioksidandır. E vitamininin koruyucu etkisi membranlarda bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri üzerinedir. E vitamininin antioksidan olarak başlıca fonksiyonu, lipid peroksidlerini etkisizleştirerek peroksidasyonu sonlandırmaktır (82).

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 (83).

Hücre Dışı Antioksidanlar

Albümin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, haptoglobin, hemopeksin, bilirubin, askorbik asit bilinen hücre dışı antioksidan maddelerdir. Genellikle etkilerini serbest demir veya bakır iyonlarını bağlayarak göstermektedirler (82).

BOSENTAN

Bosentan non-spesifik bir endotelin (ET) reseptör antagonisti olup, pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır (84,85). Endotelin vücutta doğal olarak oluşan bir peptiddir. İlk defa 1985 yılında Hickey ve ark. (84) tarafından, “*endotensin veya endothelial contracting factor*” olarak tanımlandılar. Yanagisaka ve arkadaşları 1988 yılında endotelinin farklı kromozomlardaki üç farklı endotelin geni ET-1, ET-2 ve ET-3 tarafından kodlandığını bildirdi. Endotelde, beyin, böbrek ve bazı diğer hücrelerde sentez edilen endotelin, hidrofilik yapısı nedeniyle plazma membranını geçemez ve etkisini spesifik reseptörleri vasıtası ile gösterir. ET-A ve ET-B olmak üzere iki ayrı reseptörü vardır. Düz kas hücreleri ve kalp kası hücrelerinde bulunan ET-A reseptörü vazokonstriksiyon ve hücre çoğalmasından sorumludur. ET-B reseptörü ise düz kas hücrelerinde vazokonstriksiyon ve hücre çoğalmasını uyarırken, endotel hücrelerinde NO ve prostasiklin salınımını artırır, ET yıkımına neden olur.

Bosentan pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılan nonspesifik bir endotelin tip A ve tip B reseptör antagonistidir. Bosentanın hem bağlanma çalışmalarında hem de fonksiyonel çalışmalarda ET-A reseptörleri üzerine daha etkili olduğu bildirilmiştir (85).

Endotelin antagonistlerinin güçlü vazodilatör etkisi vardır ve yakın zamanda antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (86). Endotelin antagonistlerinin iskemi modellerinde tespit edilen koruyucu özellikleri antioksidan etkileriyle de ilişkili olabilir.

Serafim ve arkadaşlarının çalışmasında, bir süperoksit anyon vericisi olan potasyum süperoksit tarafından uyarılan inflamasyon ve ağrı modelinde, bosentanın IL-10 üretimini artırırken, IL-1 β ve TNF- α üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (7).

Afyouni ve arkadaşlarının çalışmasında, endotelin antagonisti bosentanın ratlarda böbrek iskemisinde koruyucu rolü araştırılmıştır. İskemiye uğratılıp bosentan verilen grupta MDA düzeyinin sadece iskemi oluşturulan gruba göre daha düşük olduğu saptanmış ve bosentanın renal vasküler sistemdeki etkisi nedeni ile böbrek iskemisinin tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (8). Şengül ve arkadaşlarının çalışmasında, bosentanın over iskemi/reperfüzyon (IR) hasarında rolü araştırılmış. IR'nin yumurtalık dokusunda SOD aktivitesini ve GSH düzeyini azalttığı, MDA

düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. İskemden önce 30 ve 60 mg/kg dozda uygulanan bosentanın MDA düzeyini düşürdüğü, SOD ve GSH düzeyini arttırdığı saptanmış. Serum IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri IR grubunda, bosentan grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Bosentanın overlerde oksidatif hasara ve I/R'ye bağlı hasara karşı koruyucu olduğu bildirilmiş (6).

Biz de çalışmamızda; ET-1 reseptör antagonisti olan bosentanın, hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda akciğer dokusunda histopatolojik, inflamatuvar ve oksidatif stres üzerine etkilerini hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak incelemek istedik.

GEREÇ VE YÖNTEM

HAYVAN MODELİ VE TEDAVİLER

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (03.04.2017 tarih, 5 sayılı oturum, No: PAUHDEK 2017/11) 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 altı gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=6) : Oda havasında bırakılan grup.

Grup 2 (n=8) : Hiperoksi akciğer hasarı (HAH) oluşturulan grup.

Grup 3 (n=7) : Oda havasında olup, intraperitoneal (İP) bosentan verilen grup.

Grup 4 (n=7) : HAH oluşturulan ve İP salin verilen grup.

Grup 5 (n=6) : HAH oluşturulan ve erken İP bosentan verilen grup, erken bosentan tedavi grubu,

Grup 6 (n=7): HAH oluşturulan ve geç İP bosentan verilen grup, geç bosentan tedavi grubu olarak belirlendikten sonra annelerinin yanına verildi. Postnatal üçüncü gün başlayıp 13. güne kadar devam eden deneyde Grup 2, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6'daki ratlar, pleksiglastan imal edilen kapalı alanlarda hiperoksiye (oksijen konsantrasyonu: 90 ± 2) maruz bırakılarak (Şekil 3), HAH modeli için hiperoksinin indüklediği BPD rat modeli kullanıldı (87). 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 pleksiglastan imal edilen kapalı alanda hiperoksiye maruz bırakılan ratlar deney süresince aynı odada (oda ısısı, 22-25°C) bulunduruldu. Tüm rat yavruları anne sütü ile, anne ratlar standart rat yemi ile beslendi. İlaç uygulaması ve bakım sırasında tüm ratlar her gün tartıldı. Anne ratlar oksijen toksisitesinden korumak için, gün içerisinde hiperoksik ortam ile oda havası arasında periyodik yer değişimleri yapıldı. Tüm ratlara 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin intraperitoneal uygulanarak postnatal 14. günde dekapite edildi. Toraks boşluğu torakotomi ile açılarak sol akciğer dokusu biyokimyasal analizler için üç eppendorf tüpe bölünerek -80°C'de dondurularak saklandı. Sağ akciğer dokusu patolojik incelemeler için ayrı ayrı kasetlere konarak doku işleminin ardından parafine gömüldü.



Şekil 3. Deney düzeneği. Pleksiglastan imal edilen kapalı alanda hiperoksiye maruz bırakılan deney hayvanları (altta) ve üstte oda havasında bulunan deney hayvanları görülmektedir.



Şekil 4. Dekapitasyon sonrası, torakotomi ve akciğer dokusunun çıkarılması.

İlaç Uygulaması

Bosentan dozu (30 mg/kg/gün intraperitoneal doz) daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen dozlar göz önünde bulundurularak belirlendi (6). Grup 4'te ratlara İP bosentan yerine aynı hacimde %0,9'luk salin uygulandı. Bosentan geç tedavi grubuna 30 mg/kg/gün 7-13. gün arasında günde bir kez ve erken tedavi grubuna aynı dozda 3-9. gün arasında günde bir kez insülin enjektörü ile İP uygulandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Postnatal 14. günde torakotomi ile açılan göğüs boşluğundan 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, histokimyasal olarak Mason-Trikrom boyası, immünohistokimyasal kas spesifik aktin boyası ile boyandı. Konusunda uzman ve deneyimli bir patolog tarafından aşağıda belirtilen 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 rastgele 10 alan X100'lük büyütme ile 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 (88).

Fibrozinin Histolojik Değerlendirilmesi

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 X100'lük büyütme alanında 10 alan değerlendirildi. Her akciğer kesitinde fibrozis yokluğu:0, hafif fibrozis:1, orta derecede fibrozis:2, belirgin fibrozis:3 olarak skorlandı (89).

İmmünohistokimyasal Düz Kas Aktin (SMA) Boyaması ile Değerlendirme

İmmünohistokimyasal boyamalar için seçilen formalinde tespit edilmiş parafine gömülü dokulardan elektrostatik yüklü lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alındı ve etüvde 60°C'de en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere, tüm boyama süreci Ventana, BenchMark XT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Zıt boyama, Hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlandı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları elde yapılarak immünohistokimya protokolü tamamlandı. Düz kas aktine (Clone 1A4) yönelik 1/500 oranında dilüe edilen primer antikor damlatılarak 20 dakika inkübe edildi. Uygun doku kesitleri primer ve sekonder antikor için ayrıca pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlemde geçirildi. İmmünohistokimyasal skorlama için X100'lük büyütmede birbiriyle örtüşmeyen 10 periferik akciğer alanı rastgele seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 1'den 4'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak, semikantitatif skorlama ile değerlendirildi (90).

BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Doku Homojenatının Hazırlanması

Grupların sol akciğer doku örnekleri üç eppendorf tüpüne bölünerek biyokimyasal analiz için -80°C'de dondurularak saklandı. Biyokimyasal analizler için üç eppendorf tüpüne ayrılan akciğer dokuları yedi parametreyi (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, TAS, TOS ve MDA) ELİSA yöntemi ile çalışılmak üzere kitlerin içinde geçen uygun doku tamponları eklenerek homojenizatör cihazı ile homojenize edildi. Doku homojenizasyonunda *phosphate-buffered saline (PBS)* kullanıldı. Hassas terazi ile tartılan akciğer dokularının bir gramdan az olduğu saptandı ve bir gram dokuya 1 ml PBS olacak şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenizasyondan sonra 5000 X g

'de 5 dakika +4°C'de santrifügasyon yapıldı. Santrifüj edilen dokular bir gece (overnight,16 saat) -20°C'de bekletildi. Ertesi gün dokular tekrar santrifüj edilerek supernatant kısımları pellet kısımlarından ayrılarak çalışmada kullanıldı.

IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α Analizleri

Akciğer dokusunda IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeyleri ticari ELİSA kitleri (MyBioSource) ile saptandı. Sonuçlar pg/ml şeklinde ifade edildi.

- 1) ELİSA plaklarına standart ve örnek kuyucuklarına 100 μ l olacak şekilde standart ve örnek eklendi.
- 2) Plâğin üzeri kapatılarak 37°C'de 90 dakika inkübasyon sağlandı.
- 3) Plaklar yıkanmadan sadece içerisindeki standart ve örnekler çıkarılarak 100 μ l biotin konjugat eklendi.
- 4) Plakların üzeri tekrar kapatılarak 37°C inkübe edildi. Üç kez wash buffer ile yıkama yapıldı.
- 5) Her bir kuyucuğa 100 μ l Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC) working solüsyonu eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Beş kez wash buffer ile yıkama yapıldı.
- 6) Her bir kuyucuğa 100 μ l (IL-1 β için 90 μ l) Tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 7) Her bir kuyucuğa 100 μ l stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 8) 450 nm'de ELİSA reader cihazı ile absorbanslar ölçüldü. Uygun formül ile grafik çizdirilerek konsantrasyonlar hesaplandı.

Total Antioksidan Kapasite (TAS)

Total antioksidan kapasite düzeyleri ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Rel Assay Diagnostics). Daha kararlı bir durumda ve koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalinin ortamda bulunan antioksidanlarla orantılı olarak renginin kaybolması temeline dayanan bu yöntemde, ortamdaki antioksidanlar arttıkça renk kaybı da artmaktadır. Hesaplamalar hazır standart kite göre yapıldı ve sonuçlar mmol Trolox Eq/L şeklinde ifade edildi (91).

- 1) ELİSA plaklarına 30 mikrolitre standart 30 mikrolitre örnek olacak şekilde yükleme yapıldı.

- 2) Kitin içinden çıkan 500 mikrolitre reagent 1 eklendi ve 30 saniye sonra elde edilen karışım 660 nm'de 37°C'de 1. okuma yapıldı.
- 3) Ardından 75 mikrolitre reagent 2 konularak 5 dakika sonra yine 660 nm'de 37°C'de 2. okuma yapıldı.

Total Oksidan Kapasite (TOS)

Total oksidan düzeyleri ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Rel Assay Diagnostics). Bu yeni yöntem, numunelerdeki oksidan bileşiklerin ferröz iyon-odanisidin kompleksini ferrik iyona oksitlemesi temeline dayanır. Oluşan rengin koyuluğuna göre spektrofotometrik ölçüm yapılır. Bu ölçüm ortamda bulunan oksidan moleküllerin toplamını yansıtır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ olarak ifade edildi (92).

- 1) ELİSA plaklarına 75 mikrolitre standart 75 mikrolitre örnek olacak şekilde yükleme yapıldı.
- 2) Kitin içinden çıkan 500 mikrolitre reagent 1 eklendi ve 30 saniye sonra elde edilen karışım 530 nm'de 37°C'de 1. okuma yapıldı.
- 3) Ardından 25 mikrolitre reagent 2 konularak 5 dakika sonra yine 530 nm'de 37°C'de 2. okuma yapıldı.

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Oksidatif stres indeksi, $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ cinsinden TOS değerinin mmol Trolox Eq/L cinsinden TAS değerine oranıdır (93).

Lipid Peroksidasyon Ölçümü

Akciğer dokusunda MDA düzeyi ticari ELİSA kiti (YLBiont) ile saptandı. MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan, oksidatif stresin göstergesi olarak çok sık kullanılmaktadır. MDA tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Sonuçlar nmol/ml olarak tanımlandı. Bu yöntemde

tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddeler ölçülür ve literatürde TBARS olarak adlandırılır (94).

- 1) Standart kuyucuğuna 50 mikrolitre standart ve streptavidin- HRP eklendi.
- 2) Örnek kuyucuğuna 40 mikrolitre örnek 10 mikrolitre MDA antibody ve 50 mikrolitre streptavidin- HRP eklendi.
- 3) Plakların üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Beş kez wash buffer ile yıkama yapıldı.
- 4) Her bir kuyucuğa 50 mikrolitre kromogen solüsyon A ardından 50 mikrolitre kromogen solüsyon B eklendi.
- 5) 10 dakika 37°C'lik karanlık ortamda kuyucukların renklenmesi sağlandı.
- 6) 50 mikrolitre stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 7) 450 nm'de ELİSA cihazı ile kuyucukların absorbansları okundu.
- 8) Okunan absorbansları hesaplamak için uygun formül ile grafik çizdirilerek hesaplama yapıldı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 21 paket programı kullanıldı. Deney gruplarının; alveol yüzey alanı, fibrozis, imünohistokimyasal SMA skoru ve akciğer doku biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılmasında gruplar arası farklılık için *Kruskal Wallis Varyans Analizi*, iki grup karşılaştırılması için *Mann-Whitney U testi*, grup içi değişimlerde Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak ise ortanca, minimum-maksimum (min-max) değerleri kullanıldı ve *p* değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma 41 rata ait akciğer dokularının incelenmesi ile tamamlandı.

KİLO ALIMI

Çalışma gruplarının deney öncesi ve deney sonrası ortalama ağırlıkları ve karşılaştırılması Tablo 5'te belirtilmiştir. Deney öncesi gruplar arasında ortalama ağırlık bakımından anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$). Deney sonunda gruplar arası karşılaştırmada gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$). Hiperoksiye maruz bırakılan ratların ağırlıkları oda havasında tutulanlara göre düşük bulundu bu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$) (Tablo 5, Şekil 5).

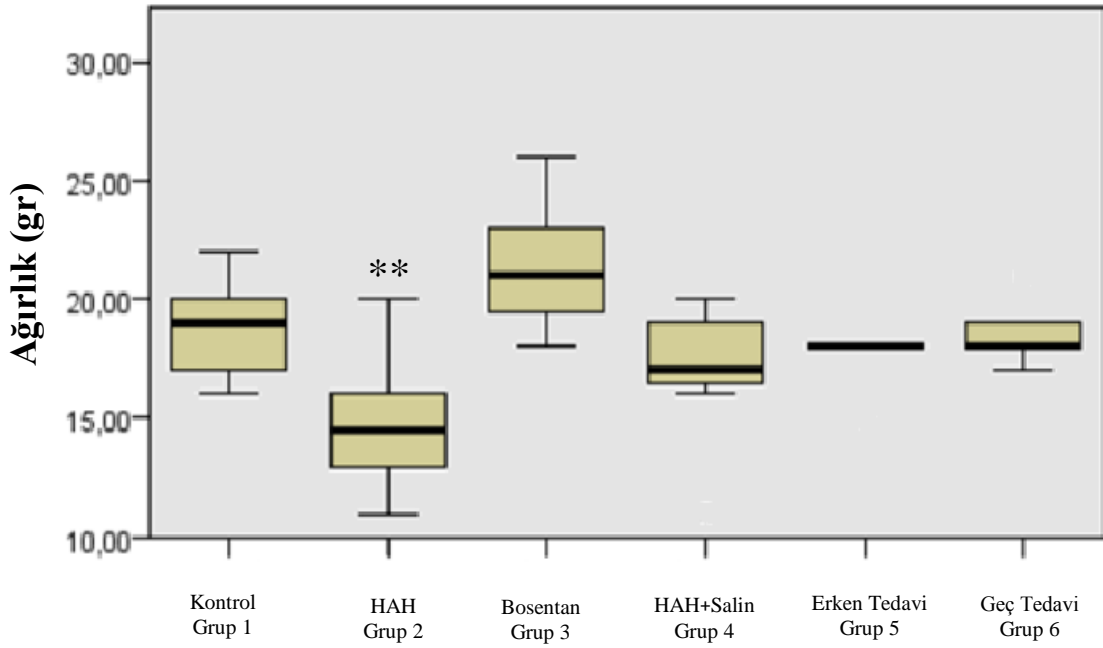
Tablo 5. Deney gruplarının deney öncesi ve sonrası ortalama ağırlıkları ve karşılaştırılması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P
Ağırlık (gr)	Kontrol (n=6)	HAH (n=8)	Bosentan (n=7)	HAH+Salin (n=7)	Erken Tedavi (n=6)	Geç Tedavi (n=7)	
Deney öncesi							
Ortanca	7*	8	9	8	8	8	< 0.05
(min-max)	(7-8)	(6-8)	(8-9)	(7-9)	(7-8)	(7-8)	
Deney sonrası							
Ortanca	19	15**	21	17	18	18	< 0.05
(min-max)	(16 - 22)	(11 - 20)	(18 - 26)	(11 - 20)	(17 - 21)	(15- 18)	

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı.

* Grup 1 < Grup 3 ($p < 0.05$).

** Grup 2 < Grup 3 ($p < 0.05$).



Şekil 5. Grupların deney sonrası ağırlık dağılımı

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Alveol Yüzey Alanının Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması Tablo 6’da belirtilmiştir. Oda havasında bırakılan ratlara göre, hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda alveol yüzey alanında belirgin azalma saptandı ($p < 0.01$). Hiperoksiye maruz bırakılan ratların (grup 2) %25’inde alveol yüzey alanında orta derece azalma, %62.5’inde belirgin azalma, hiperoksiye maruz bırakılan salin verilen ratların (Grup 4) %71.4’ünde orta derece azalma, % 28.6’sında belirgin azalma saptanırken hiperoksiye maruz bırakılan ve geç bosentan verilen (Grup 6) ratların hiçbirinde belirgin bir azalma saptanmadı. Grup 2 ile Grup 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.01$). Erken bosentan tedavi grubunda (Grup 5) %16.7 belirgin azalma saptanırken; Grup 2 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 6). Bosentanın geç tedavi grubunda HAH grubuna göre alveol yüzey alanını belirgin olarak düzelttiği gösterildi (Şekil 6).

Tablo 6. Deneş gruplarının alveol yüzey alanı skorları ve karşılaştırılması

Alveol Yüzey Alanı	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	<i>p</i>
	Kontrol (n=6)	HAH (n=8)	Bosentan (n=7)	HAH+Salin (n=7)	Erken Tedavi (n=6)	Geç Tedavi (n=7)	
Değişim yok (Skor:0) (%)	3 (%50)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%16.7)	2 (%28.6)	
Hafif azalma (Skor:1) (%)	3 (%50)	1 (%12.5)	6 (%87.7)	0 (%0)	2 (%33.3)	4 (%57.1)	
Orta derecede azalma (Skor:2) (%)	0 (%0)	2 (%25)	0 (%0)	5 (%71.4)	2 (%33.3)	1 (%14.3)	
Belirgin azalma (Skor:3) (%)	0 (%0)	5 (%62.5)	1 (%13.3)	2 (%28.6)	1 (%16.7)	0 (%0)	
Ortanca (min-max)	0 (0-1)	3 (1-3)*	1 (1-3)	2 (2-3)*	1 (0-3)	1 (0-3)	<0.01

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı.

* Grup 2 ve Grup 4 > Grup 1 ve Grup 6 (p<0.01).

Fibrozisin Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarının fibrozis skorları ve karşılaştırılması Tablo 7’de belirtilmiştir. Hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda, fibrozis skoru oda havasında tutulanlara göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulundu. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplar fibrozis skoru açısından değerlendirildiğinde, HAH grubunun %75’inde hafif %25’inde orta, HAH+salin grubunun %100’ünde hafif fibrozis saptandı. HAH+geç bosentan tedavi grubunun (Grup 6) hiçbirinde belirgin fibrozis yokken, HAH+erken bosentan tedavi grubunun (Grup 5) %50’sinde hafif fibrozis saptandı. Grupların hiçbirinde belirgin fibrozis yoktu. Grup 2 ve Grup 4’te fibrozis skoru Grup 1, Grup 3 ve Grup 6’ya göre belirgin yüksek saptandı (p<0.01) (Tablo7). Bosentanın geç tedavi grubunda HAH grubuna göre fibrozisi belirgin şekilde azalttığı gösterildi (Şekil 7).

Tablo 7. Deney gruplarının akciğer fibrozis skorları ve karşılaştırılması

Fibrozis	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	p
	Kontrol	HAH	Bosentan	HAH+Salin	Erken Tedavi	Geç Tedavi	
	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	
Yok (Skor:0) (%)	6 (%100)	0 (%0)	7 (%100)	0 (%0)	3 (%50)	7 (%100)	
Hafif (Skor:1) (%)	0 (%0)	6 (%75)	0 (%0)	7 (%100)	3 (%50)	0 (%0)	
Orta (Skor:2) (%)	0 (%0)	2 (%25)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
Belirgin (Skor:3) (%)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
Ortanca (min-max)	0 (0-0)	1 (1-2)*	0 (0-0)	1 (1-1)*	0 (0-1)	0 (0-0)	< 0.01

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı.

* Grup 2 ve Grup 4 > Grup 1, Grup 3 ve Grup 6 (p < 0.01).

SMA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

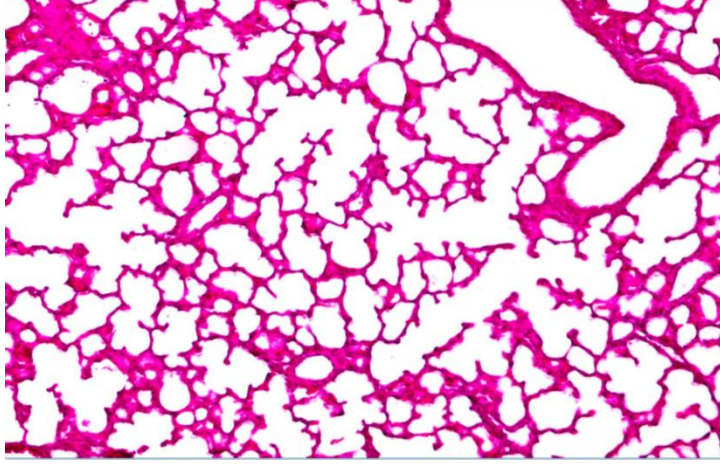
Çalışma gruplarının SMA skorları ve karşılaştırılması Tablo 8 belirtilmiştir. SMA ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, HAH'a maruz kalan gruplarda akciğerde düz kas içeriğinin artmış olduğu görüldü. Hiperoksiye maruz kalan gruplar SMA skoru açısından değerlendirildiğinde, HAH+erken bosentan tedavi grubunda (grup 5) ve HAH+geç bosentan tedavi grubunda (grup 6) hiperoksi gruplarına göre ortanca SMA skoru daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.01) (Tablo 8). Hem erken tedavi hem de geç tedavi grubunda bosentanın SMA skorunu HAH grubuna göre belirgin azalttığı gösterildi (Şekil 8).

Tablo 8. Deney gruplarının akciğer SMA skorları ve karşılaştırılması

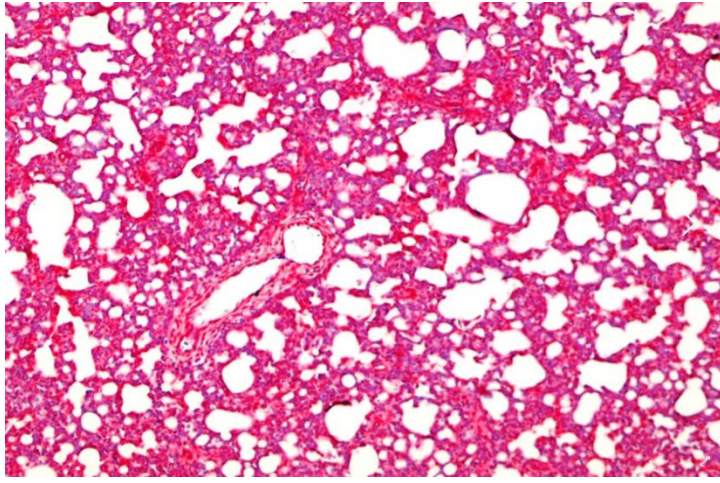
SMA skoru	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P
	Kontrol	HAH	Bosentan	HAH+Salin	Erken Tedavi	Geç Tedavi	
	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	
Ortanca	1	3*	1	2	1	1	
(min-max)	(1-2)	(2-4)	(1-2)	(1-4)	(1-2)	(1-2)	< 0.01

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı.

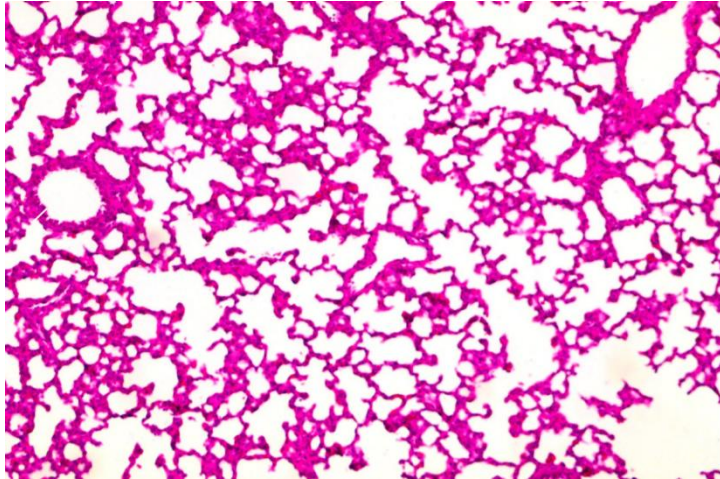
* Grup 2 > Grup 1, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6 (p < 0.01).



Şekil 6 A

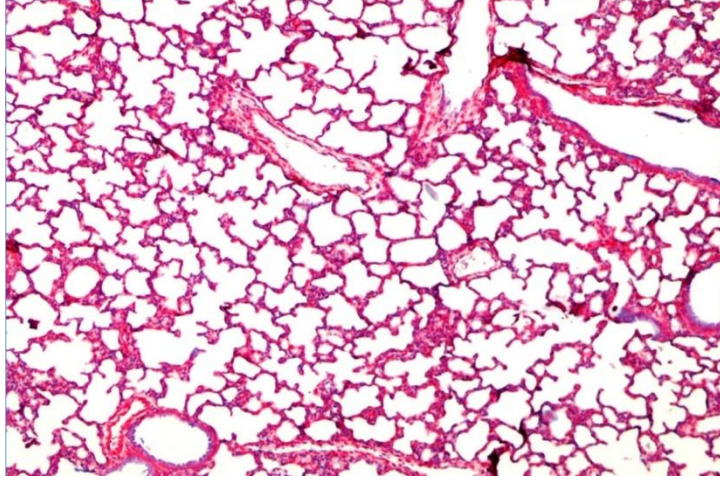


Şekil 6 B

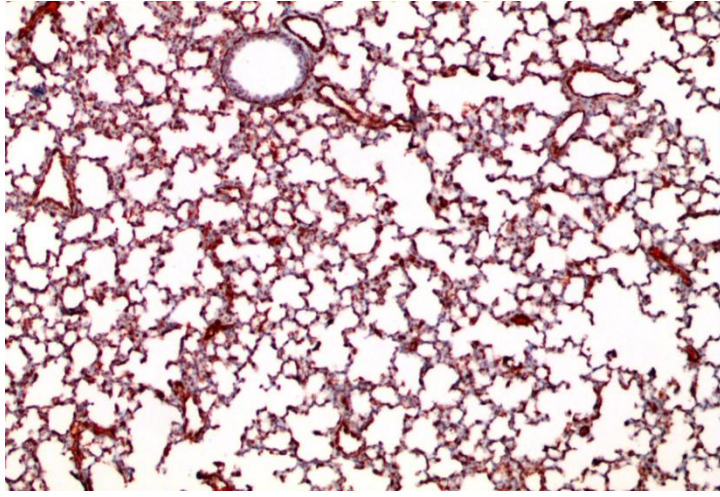


Şekil 6 C

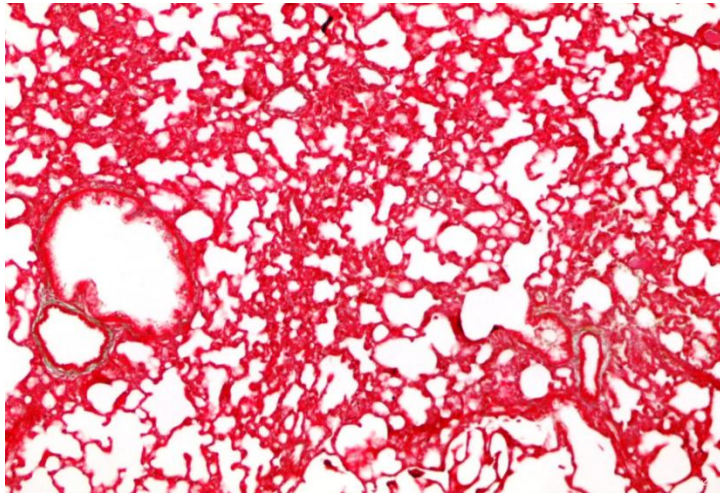
Şekil 6. Çalışma gruplarında alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası, kontrol grubu (Grup 1) B) HAH oluşturulan grup (Grup 2) C) Geç bosentan tedavi grubu (Grup 6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında yoğun hücre infiltrasyonu ve alveol yüzey alanında azalma dikkat çekmekte, alveol yüzey alanında azalma Grup 2’de daha belirgin görülmektedir (X4, H&E boyama).



Şekil 7 A

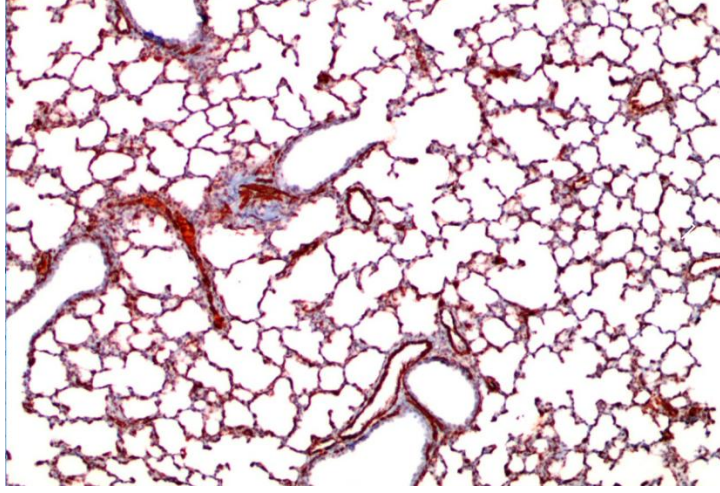


Şekil 7 B

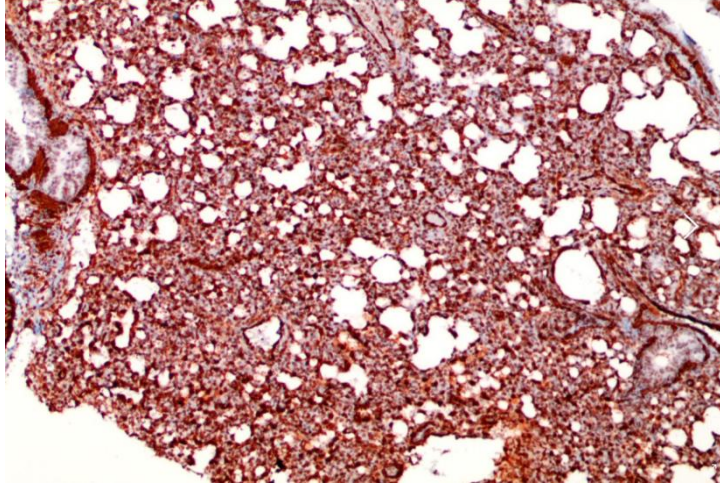


Şekil 7 C

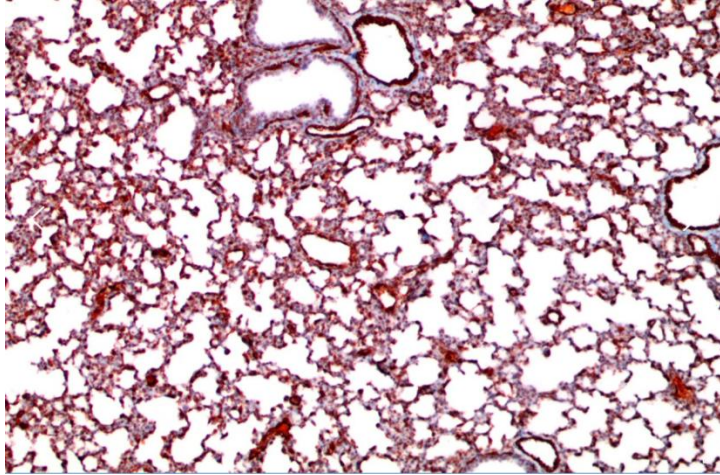
Şekil 7. Çalışma gruplarında fibrozisin değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası, kontrol grubu (Grup 1) B) HAH oluşturulan grup (Grup 2) C) Geç bosentan tedavi grubu (Grup 6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında fibrozis artışının Grup 2’de daha belirgin olduğu görülmektedir (X4, Mason-Trikrom boyama).



Şekil 8 A



Şekil 8 B



Şekil 8 C

Şekil 8. Çalışma gruplarında SMA ekspresyonunun değerlendirildiği akciğer kesitleri: A) Oda havası, kontrol grubu (Grup 1) B) HAH oluşturulan grup (Grup 2) C) Geç bosentan tedavi grubu (Grup 6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiperoksi gruplarında düz kas aktin içeriği artışının Grup 2'de daha belirgin görülmektedir (X10, SMA boyama).

BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

Proinflamatuvar Sitokin Düzeyleri

Çalışma gruplardaki ratların akciğer dokusu IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 9 belirtilmiştir. HAH oluşturulan gruplarda (Grup 2 ve 4) TNF- α düzeyi kontrol grubuna göre yüksek saptansa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Erken ve geç bosentan tedavi gruplarında HAH gruplarına göre TNF- α düzeylerini belirgin azalttığı, bu azalmanın her ikisinde de HAH grubuna göre anlamlı olduğu saptandı ($p<0.01$) (Şekil 9).

HAH grubunda (Grup 2) IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek saptansa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Ancak bosentanın TNF- α ' da olduğu gibi IL-6 düzeylerini ister erken tedavi ister geç tedavi grubunda HAH grubuna göre belirgin azalttığı görüldü ($p<0.01$). Ayrıca bosentan geç tedavi grubunda IL-6 düzeylerini HAH+salin grubuna göre de belirgin azalttı ($p<0.01$) (Şekil 10). IL-1 β düzeyleri değerlendirildiğinde en yüksek düzeylerin HAH uygulanan gruplarda (Grup 2 ve 4) olduğu, bosentanın erken ve geç olarak uygulanması ile IL-1 β 'nin HAH gruplarına göre düzeyinin azaldığı saptansa da bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Şekil 11).

Tablo 9. Deneysel gruplarının akciğer dokusu proinflamatuvar sitokin düzeyleri ve karşılaştırılması

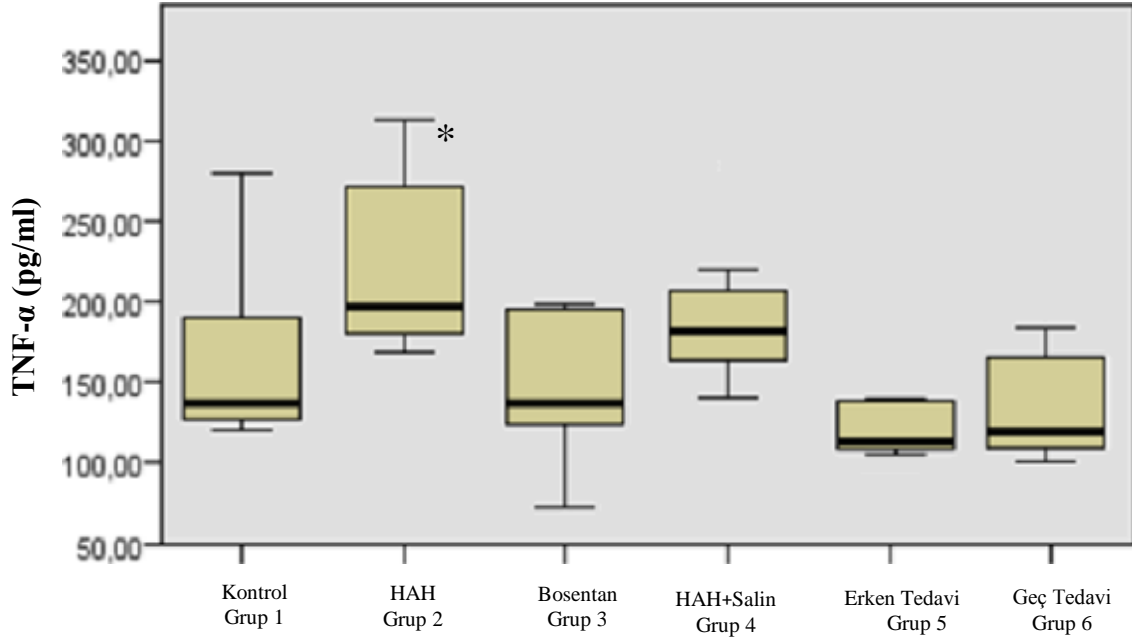
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	<i>p</i>
	Kontrol	HAH	Bosentan	HAH+Salin	Erken Tedavi	Geç Tedavi	
	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	
	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	
	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	
TNF-α	137.77	196.47*	137.77	181.18	111.63	115.09	< 0.01
(pg/ml)	(121.30-279.83)	(169.34-313.37)	(72.67-197.95)	(139.75-283.78)	(102.54-134.53)	(98.32-180.19)	
IL-6	154.63	168.27**	91.78	145.29***	59.88	67.11	< 0.01
(pg/ml)	(112.62-286.79)	(88.77-291.27)	(20.93-141.02)	(104.95-323.62)	(44.33-184.09)	(31.94-148.63)	
IL-1β	66.81	93.32	79.22	92.97	69.44	73.81	> 0.05
(pg/ml)	(44.69-96.75)	(51.07-210.56)	(67.59-106.50)	(79.22-111.71)	(48.68-115.42)	(47.88-127.16)	

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı, TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa, IL-6: İnterlökin-6, IL-1 β : İnterlökin 1 beta.

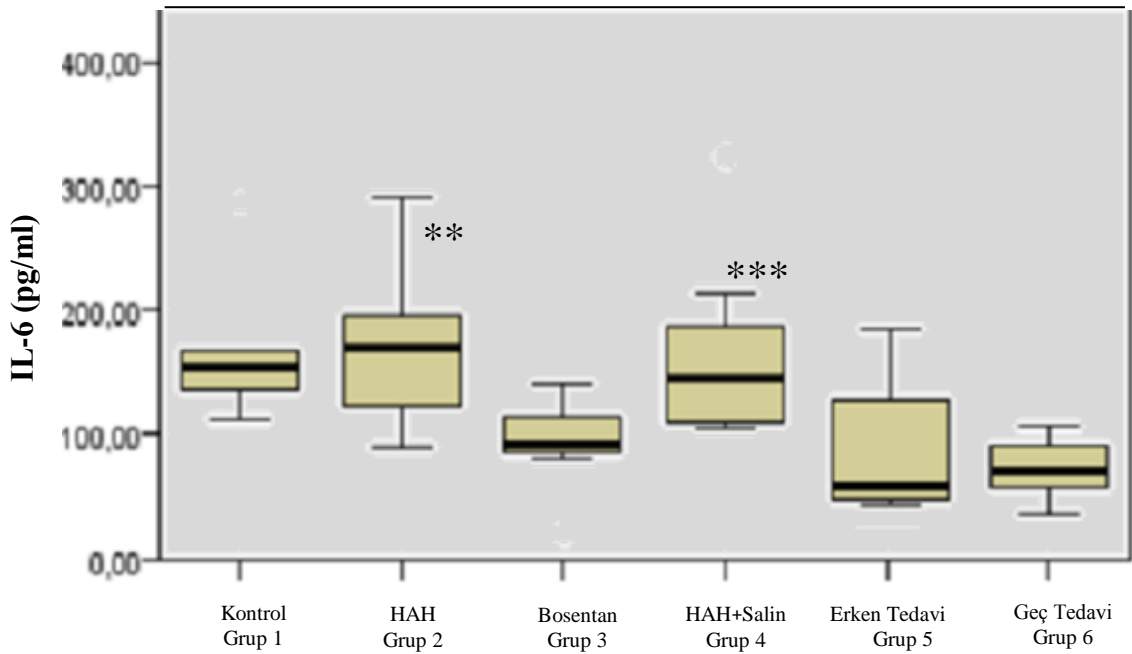
* Grup 2 > Grup 5 ve Grup 6 (< 0.01).

** Grup 2 > Grup 5 ve Grup 6 (< 0.01).

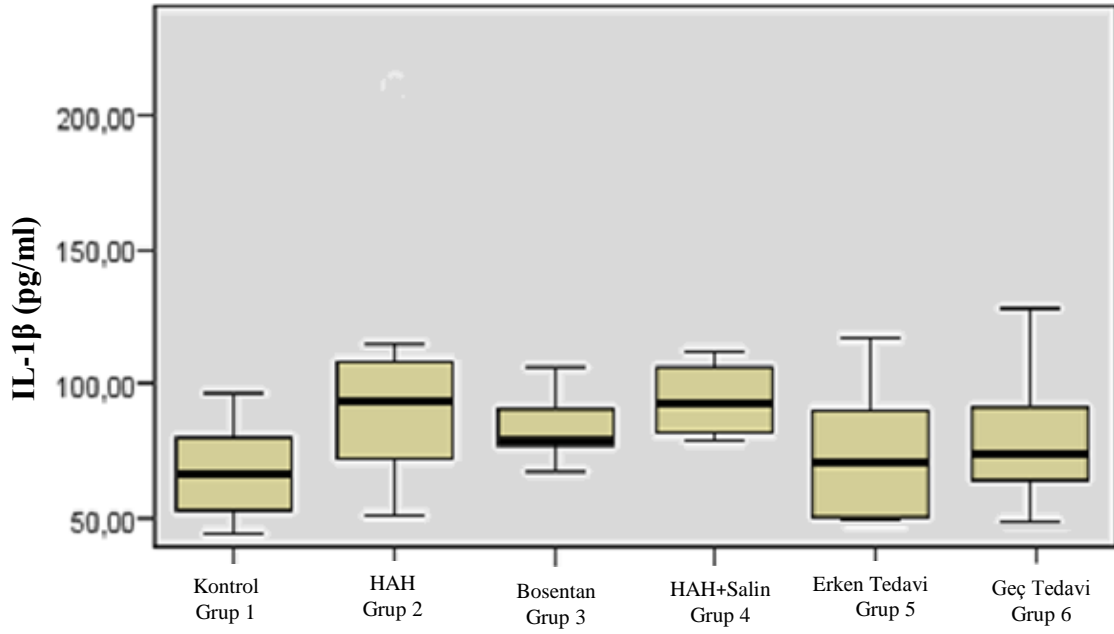
*** Grup 4 > Grup 6 (< 0.01).



Şekil 9. Grupların akciğer dokusu TNF- α düzeylerinin dağılımı



Şekil 10. Grupların akciğer dokusu IL-6 düzeylerinin dağılımı



Şekil 11. Grupların akciğer dokusu IL-1β düzeylerinin dağılımı

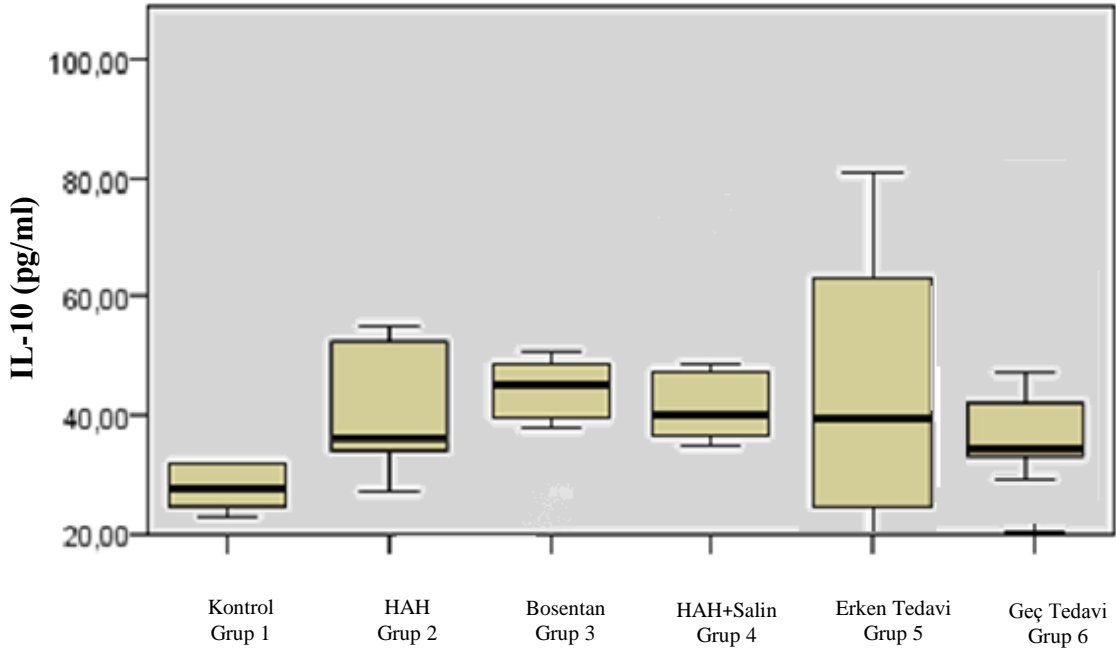
IL-10 Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu IL-10 düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 10’da belirtilmiştir. IL-10 düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 12).

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

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P
	Kontrol	HAH	Bosentan	HAH+Salin	Erken Tedavi	Geç Tedavi	
	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	
	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	
	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	
IL-10	27.41	36.09	44.95	39.8	40.4	33.78	
(pg/ml)	(22.9 -62.23)	(26.95-54.95)	(24.7-91.38)	(34.7-76.6)	(20.23-81.65)	(28.76-46.84)	> 0.05

HAH: Hiperoksik akciğer hasarı, IL-10: İnterlökin-10.



Şekil 12. Grupların akciğer dokusu IL-10 düzeylerinin dağılımı

Oksidatif Stres Belirteci Düzeyleri

Çalışma gruplarındaki ratların akciğer dokusu TAS, TOS, OSİ ve MDA düzeyleri ve karşılaştırılması Tablo 11’de belirtilmiştir.

TAS değeri açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$). En yüksek TAS değeri Grup 3’te olup, HAH oluşturulan gruplara (Grup 2 ve 4) göre bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). TOS değeri açısından gruplar karşılaştırıldığında sadece Grup 3 ve Grup 6 arasında anlamlı farklılık görüldü ($p < 0.05$). Gruplar arasında OSİ ve MDA bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15).

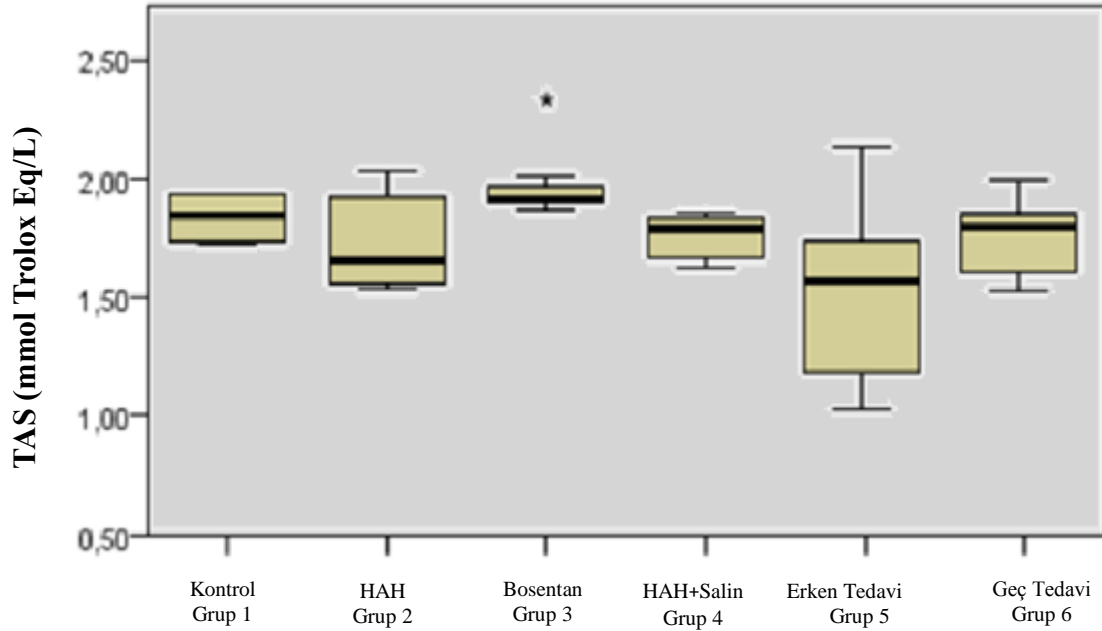
Tablo 11. Deney gruplarının akciğer dokusu oksidatif stres belirteci düzeyleri ve MDA karşılaştırılması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P
	Kontrol	HAH	Bosentan	HAH+Salin	Erken Tedavi	Geç Tedavi	
	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	
	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	Ortanca	
	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	(min-max)	
TAS	1.84	1.66	1.91*	1.79	1.62	1.81	< 0.05
(mmol Trolox Eq/L)	(1.72 - 2.35)	(0.86 - 2.03)	(1.87 - 2.33)	(1.42 - 1.86)	(1.07 - 2.17)	(1.55 - 2.01)	
TOS	6.1	4.93	5.75**	4.8	4.66	4.25	< 0.05
($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	(4.8 - 8.36)	(4.38 - 7.53)	(4.8 - 12.74)	(3.97 - 5.07)	(3.97 - 7.26)	(3.84 - 5.21)	
OSİ	0.3	0.31	0.29	0.26	0.26	0.23	> 0.05
(Arbitrary Unit)	(0.26-0.48)	(0.22-0.63)	(0.23-0.54)	(0.24- 0.34)	(0.22-0.67)	(0.22-0.32)	
MDA	1.13	1.2	1.24	1.18	1.34	1.32	> 0.05
(nmol/ml)	(0.97 - 1.41)	(0.99 - 1.32)	(0.98 - 1.31)	(1.09 - 1.34)	(1.18 - 1.43)	(1.15 - 1.39)	

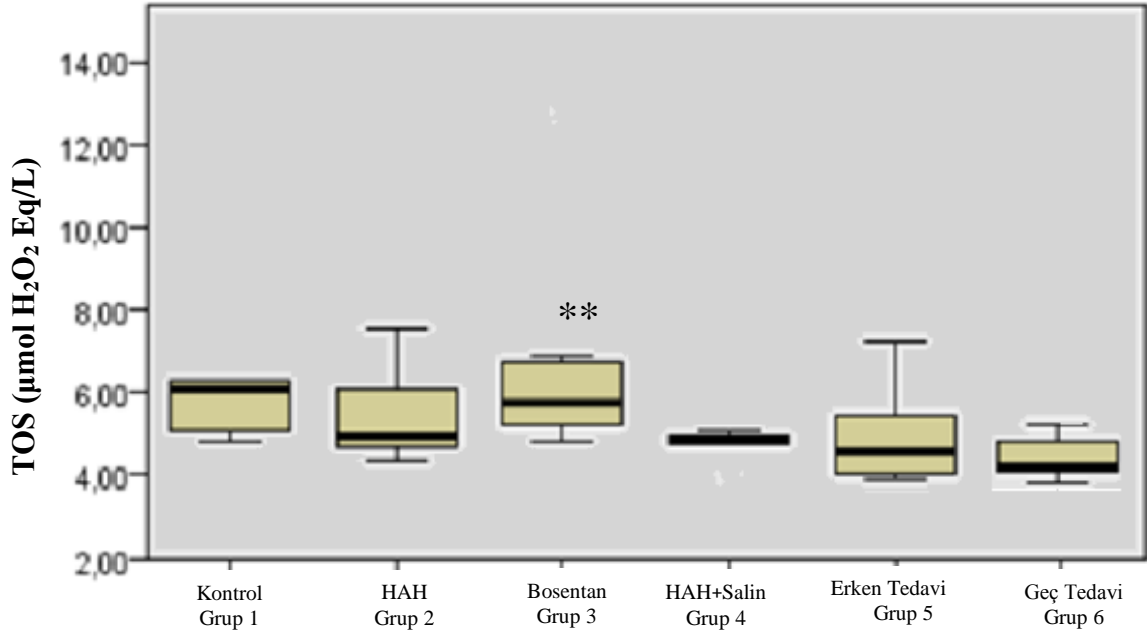
HAH: Hiperoksik akciğer hasarı, TAS: Total antioksidan kapasite, TOS: Total oksidan kapasite, OSİ: Oksidan stres indeksi, MDA: Malondialdehid.

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

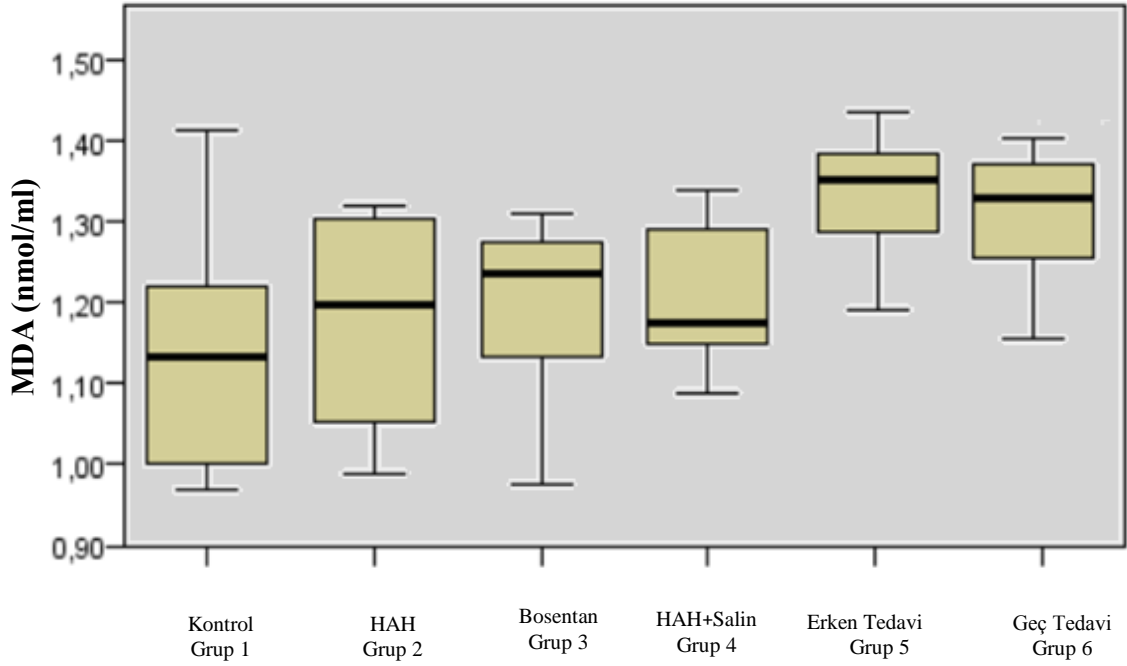
** Grup 3 > Grup 6 (p< 0.05).



Şekil 13. Grupların akciğer dokusu TAS düzeylerinin dağılımı



Şekil 14. Grupların akciğer dokusu TOS düzeylerinin dağılımı



Şekil 15. Grupların akciğer dokusu MDA düzeylerinin dağılımı

TARTIŞMA

Northway ve ark.(1)'nin BPD'yi tanımından yaklaşık 50 yıl geçmesine rağmen BPD hala yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen prematüre bebeklerin en sık görülen komplikasyonlarından biri olmaya devam etmektedir (1,36). Son 50 yılda, neonatoloji alanındaki teknolojik gelişmeler, daha az hasar verici ventilasyon yöntemlerinin kullanılması, yenidoğan bakım kalitesinin artması, prenatal steroid ve postnatal sürfaktan uygulaması gibi pek çok yenilikler sonucu daha küçük ve immatür bebeklerin (25-28 hafta) yaşama şansı artmış; bununla birlikte bu bebeklerde “yeni BPD” olarak tanımlanan klinik, radyolojik ve histopatolojik bulguları daha hafif seyirli olan BPD görülmeye devam etmiştir.

Bronkopulmoner displazi etiyojisi tam olarak bilinmemektedir, ancak BPD gelişiminde doğum öncesi dönemden başlayarak, doğum sırasında ve doğumdan sonra çıkan birçok risk faktörü rol oynamaktadır. Bu risk faktörlerinin bir kısmı önlenemez olmakla birlikte immatürite, baro/volütravma, oksidan stres, intrauterin başlangıcı olabilen infeksiyon/inflamasyon ve proteolitik zedelenme mekanizmaları ve bazı antenatal faktörler yoğun olarak BPD'den sorumlu tutulmaktadır (95).

Akciğer inflamasyonu BPD patogenezi üzerinde belirgin öneme sahiptir. Koryoamniyonit ve ortaya çıkan inflamasyona, ilerleyen süreçte fetüsün verdiği tepki, fetal inflamatuvar cevap sendromu (FİCS) olarak isimlendirilir. Genellikle fetal inflamatuvar yanıt ile başlayan akciğer inflamasyonu, mekanik ventilasyon ve oksijen tedavisi ile şiddetlenir. İnflamatuvar yaralanma ile ilişkili doku hasarı sıklıkla proinflamatuvar sitokinlerin aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu sitokinler havayolu ve alveol epitel hücreleri, endotelium ve fibroblastlar gibi akciğer parankiminin çeşitli hücrelerine ek olarak havayolu ile intertisyumdaki nötrofiller ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından sentezlenmektedirler (20).

Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması, aşırı serbest radikal oluşumu ve antioksidan sisteminin yetersizliği BPD patogeneziinde önemli diğer mekanizmalardan biridir. Özellikle prematüreler oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır. Bunun başlıca sebepleri arasında yüksek konsantrasyonda oksijene maruziyet, enfeksiyon ve inflamasyon,

antioksidan savunma sisteminin zayıf olması ve serbest demir düzeylerinin yüksekliği sayılabilir (96).

Halen BPD için etkinliği kanıtlanmış bir tedavi bulunmamakta ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Bronkopulmoner displazi patogenezindeki ana nedenlerden biri olan oksijen toksisitesi, hayvan çalışmalarında BPD modeli oluşturmak amacıyla kullanılmış ve hiperoksinin immatür akciğerlerde alveolizasyonu engellediği, daha geniş ve basit alveollerin oluştuğu gösterilmiştir (97). Bu amaçla çalışmamızda, akciğer gelişim evresi insanlardaki geç sakküler ve erken alveolar dönem ile uyumlu olan yenidoğan ratlar BPD için önemli risk faktörü olan hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturuldu ve bosentanın akciğer dokusunda alveol yüzey alanı, fibrozis, düz kas hiperplazisi, oksidan stres belirteçleri ve antioksidan enzimler ile proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkileri araştırıldı.

BPD gelişen prematüre bebeklerde postnatal büyüme ve gelişme geriliği sık görülür. Malnutrisyon akciğer büyümesini, maturasyonunu ve tamir mekanizmalarını olumsuz etkiler. Bunun nedenleri arasında İUGG, yetersiz protein ve enerji alımı, solunum iş yükünün fazla olması, inflamasyon, steroid tedavisi, katabolizmanın artması ve enteral beslenme sorunları (beslenme intoleransı, gastroösefageal reflü) sayılabilir (45). Çalışmamızda deney sonunda hiperoksik akciğer hasarına maruz bırakılan ratların ağırlıklarının düşük olduğu görüldü (Bkz.Tablo 5). Bu sonuçlar hiperoksik akciğer hasarı oluşturularak yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir (98). Çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarına maruz kalan ratlara kıyasla, bosentan verilen grupta kilo artışı daha fazla olmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Etkili bir gaz alışverişi için akciğer yüzey alanının artması, yani alveol sayısı ve kan damarlarının artması ve ince bir alveol-kapiller bariyeri gereklidir. Bu değişiklikler yani sekonder septasyon, distal pulmoner mikrovasküler maturasyonun yüzey alanını arttırması ve intertisyel aralıkların daralması, sırasıyla akciğer gelişiminin ileri evrelerinde, sakküler ve alveolar dönemde gerekleşişir (17). Sakküler evre ve daha sonra oluşan akciğer hasarlanmasında alveol yapısı basitleşişir ve alveol sayısı azalır ancak gelişen patoloji daha hafiftir (16). Eski BPD, skuamoz metaplazi, belirgin hava yolu düz kaslarının belirgin hiperplazisi, geniş alveoler septal fibrozis

ve pulmoner arterlerin hipertansif yeniden modellenmesi gibi şiddetli hava yolu epitel lezyonları ile karakterizedir (1). Yeni BPD ise, geniş basitleşmiş alveolar yapı, azalmış ve dismorfik vasküler yatak, nadir epitel lezyonları ve hafif havayolu düz kas kalınlaşması ile karakterizedir (16,18).

Alveol yüzey alanı, alveolizasyon ile doğru orantılı olup ve alveol gelişimi için yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Benzer hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturulmuş diğer hayvan çalışmalarındaki gibi çalışmamızda da hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda alveol yüzey alanında belirgin azalma olduğu görüldü (99). Ratlarda hiperoksik akciğer hasarında resveratrolün etkilerini araştıran Özdemir ve ark.'nın çalışmasında da hiperoksiye maruz bırakılan ratların alveol yüzey alanında belirgin azalma saptanırken, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi olan resveratrolün hiperoksiye maruz bırakılan akciğerde alveol yüzey alanında azalmayı engellediği saptanmıştır (100). Bizim çalışmamızda da hiperoksiye maruz bırakılarak geç bosentan verilen grubun hiçbirinde alveol yüzey alanında belirgin azalma saptanmamıştır. Bosentanın geç tedavi grubunda hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan gruba göre alveolar yüzey alanını belirgin düzelttiği gösterilmiştir. Bulgularımız, yenidoğan ratlarda geç bosentan tedavisinin erken bosentan tedavisine göre alveolarizasyon süreçte daha olumlu bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Ölen BPD'li hastaların otopsi bulguları antenatal ve postnatal dönemde uygulanan yeni tedavi yöntemlerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sürfaktan kullanımından önceki dönemlerde BPD'de en belirgin patolojik bulgu hava yolu hasarı, inflamasyon ve parankimal fibrozisken, yakın zamanda BPD nedeni ile ölen bebeklerin otopsilerinde akciğerlerde fibrozisin daha az görüldüğü bildirilmektedir (101). Günümüzde BPD'nin yeni histopatolojik bulguları, daha az sayıda geniş, basitleşmiş alveol yapısı, hafif vasküler lezyonlar ve değişken oranda fibroproliferasyon ile karakterizedir (16,18).

Prematüre bebekler yüksek konsantrasyonda oksijene, dolayısıyla reaktif oksijen metabolitlerine maruz kalmaktadır. Oksidan stresin artışıyla birlikte hücresel yapılarda zedelenme ve hücre ölümü gerçekleşmekte, daha sonra fibrozis gelişerek BPD kliniği ortaya çıkmaktadır (102). BPD'deki doku zedelenmesinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri, TGF- β 'nin ve reseptörlerinin aşırı üretiminden kaynaklanan hatalı tamir mekanizmaları ve fibrozistir. TGF- β normalde inflamatuvar

reaksiyonu sınırlamakta ve doku tamirinde önemli rol oynamaktadır. Fibroblastik aktivitenin temel indükleyici faktörlerinden birisi olan TGF- β proteini, latent TGF- β bağlama proteinlerine (LTBP) bağlanarak aktif olmayan ekstrasellüler matriks (ECM) salgılanmasına neden olur. İnflamatuvar hücrelerden salgılanan TGF- β ECM'in yeniden şekillenmesini de sağlar. TGF- β yolağının aktivasyonu sonucu hem ligand reseptör kompleksi, SMAD proteinlerinin fosforilasyonu hem de kollagen doku büyüme faktörü (CTFG) gibi pro-fibrotik sitokinlerin üretimi arttırmaktadır (103).

Öncel ve arkadaşlarının çalışmasında (99) hiperoksik akciğer hasarı oluşturulmuş hayvan modelinde, hiperoksi grubunda TGF- β düzeyi yüksek saptanmıştır. Farklı hayvan BPD modellerinde yapılan çalışmalarda, normal akciğer gelişimi için önemli role sahip olan TGF- β yapımı artışının hastalık patofizyolojisinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (104).

Fibrozis, aktif (myo)fibroblastların aşırı büyümesi ve normal dokunun kalıcı skar dokusu ile yer değiştirmesi olarak tanımlanır. Miyofibroblastlar ET-1 de dahil olmak üzere çeşitli uyarımlarla aktive edilir. ET-1, fibrozis patogenezinde temel rol oynar. ET-1 ekspresyonunu tetikleyen, otokrin etki oluşturan TGF- β 1, diğer ajanların profibrotik etkileri için aracı olabilir. ET-1, fibroblast hücreleri için kemotaktiktir ve fibroblast proliferasyonuna ve her iki ET-1 reseptörünün (ETA ve ETB) aracılık ettiği ECM birikimine ve büzülmesine neden olur (105). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, fibroblastların, SMAD 2/3 fosforilasyonundan bağımsız c-abl kinaz aktivitesini stimüle ederek TGF- β 'yı etkilediğini ve c-abl kinazın fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü stimüle ettiğini ileri sürmektedir (106). Bosentanın etkisinin hem ET-1 hem de c-abl sinyal yollarının bloke edilmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak endotelin reseptör antagonisti olan bosentan, fibrozis gelişimini önlemede terapötik bir potansiyele sahiptir. Bizim çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratların tamamında fibrozis gelişirken (%75'inde hafif %25'inde orta fibrozis), hiperoksi+ salin grubunun %100'ünde hafif fibrozis saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda geç bosentan tedavi grubundaki ratların hiçbirinde belirgin fibrozis görülmemiştir. Erken bosentan tedavi grubunda ise belirgin fibrozis görülmezken, %50 hafif fibrozis saptanmıştır. Bu çalışmada

bosentanın hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratlarda akciğer fibrozisini belirgin azalttığını gösterdik.

Chilakapati ve ark.'nın (107) çalışmasında bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozis modelinde matriks metalloproteinaz (MMP)-9'un azalması, metalloproteinazların doku inhibitörü (TIMP)-1'in artması, MMP ve TIMP arasındaki dengesizliğin akciğer fibrozisine, kollajen birikimine ve ECM bozulmasına yol açtığı gösterilmiş olup; bosentanın MMP-9 düzeylerinde artış ve TIMP-1 düzeylerinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Deneysel hayvan modellerinin histopatolojisi, insanlardaki pulmoner fibrozis ile benzerlik gösterdiği için, bosentanın pulmoner fibrozis tedavisi için yeni bir ilaç olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bosentan tedavisinin inflamasyonu ve fibröz hiperplazi düzeyini azaltarak, MMP-9 düzeyini arttırarak ve TIMP-1 düzeyini azaltarak akciğeri koruduğu düşünülebilir. Bu çalışmada α -SMA ekspresyonu ile karakterize interstisyel miyofibroblastlar immünohistokimyasal olarak da incelenmiştir. Bleomisin uygulanarak pulmoner fibrozis oluşturulan ratlarda, kontrol grubuna kıyasla α -SMA ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. Bosentanın α -SMA ekspresyonunu belirgin olarak düşürdüğü saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da SMA skoru açısından değerlendirildiğinde, hem erken hem de geç tedavi grubunda, bosentanın SMA skorunu hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan gruba göre anlamlı şekilde düşürdüğü saptanmıştır. ET-1'in ETA-JNK-AP-1 yolu ile insan akciğer fibroblastlarında α -düz kas aktin ekspresyonunu ve miyofibroblastları indüklediği gösterilmiştir (108). Endotelin reseptör antagonisti olan bosentanın da akciğer SMA ekspresyonunu azalttığını düşünüyoruz.

Çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarına maruz bırakılan ve bosentan 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 (109).

Bronkopulmoner displazi gelişiminde önemli patofizyolojik mekanizmalardan birisi de antenatal dönemde oluşan inflamasyon ve/veya enfeksiyondur. İnflamatuar hasarla ilişkili doku hasarı proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla oluşmaktadır. Bu sitokinler havayolu ve alveol epitel hücreleri, endotelyum ve fibroblastlar gibi

akciğer parankiminin çeşitli hücrelerine ek olarak havayolu ile interstisyumdaki nötrofiller ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından sentezlenmektedirler (20).

Genel proinflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 bu kategoride en çok çalışılan sitokinler ve preterm bebeklerde kötü pulmoner sonuçların tahmininde önemli biyolojik belirteçlerdir (109,110). Bu sitokinlerin düzeyleri, ek oksijen ve mekanik ventilasyon süresiyle ilişkili olup; BPD gelişen bebeklerde aynı gestasyonel haftadaki BPD gelişmeyen bebeklere kıyasla artmaktadır (109). Yapılan bir çalışmada BPD gelişen bebeklerin alveolar hücrelerinde ve hava yolu sekresyonlarında proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8 gibi) yüksek bulunmuştur (42). İnflamatuvar yanıtın erken evrelerinde görülen TNF- α , ventilatör bağımlı preterm bebeklerin trakeal aspirat örneklerinde yüksek saptanmış ve yenidoğan mortalitesi ile ilişkili bulunmuştur (110). Trakeal aspirat sıvısında IL-1 β düzeylerinin artışı ile mekanik ventilasyon ve oksijen destek ihtiyacı arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (111). Artan IL-1 β düzeyleri ve IL1 β /IL6 oranlarının BPD gelişimi için önemli risk faktörleri olduğu özellikle *Ureaplasma urealyticum* ile kolonizasyon ile de BPD'nin ilişkili olduğu bildirilmektedir (112).

Bronkopulmoner displazi etiyopatogenezi düşünüldüğünde çalışmamızda da hiperoksik akciğer hasarının ratlarda akciğer dokusunda proinflamatuvar sitokin düzeylerini belirgin olarak arttırdığı görülmüştür. Oda havası ve HAH grubu ratlar karşılaştırıldığında IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri HAH grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratlarda bosentanın hem erken hem geç tedavi grubunda TNF- α , IL-6 düzeyini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı ve IL-1 β düzeyini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşürdüğü saptanmıştır (Tablo 9).

Birçok çalışmada ET-1'in vasküler duvardaki inflamatuvar sürecin gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. ET-1 NF- κ B transkripsiyon faktörünü aktive ederek ve TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır (113). Bellisai ve ark. (114), ET-1'in makrofajlar ve monositlerdeki TNF- α sentezini arttırdığını bildirmiştir. TNF- α , makrofajların, monositlerin ve nötrofillerin kemotaksisi ve fagositozunu uyararak inflamatuvar cevabı artırır. Chen ve ark.'nın (115) çalışmasında, endotelin reseptör antagonisti bosentanın, intraperitoneal olarak

uygulanan sigara dumanı ekstrası ile indüklenen oksidatif stres modelinde sıçan akciğerlerinde TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik BPD gelişimindeki önemli etmenlerden biridir. Proinflamatuvar sitokinlerin aktivite artışının dengelenmesinde en önemli rolü oynayan antiinflamatuvar sitokinlerden birisi IL-10'dur. IL-10'un yetersiz üretimi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar dengede bozulmaya, dolayısıyla BPD gelişimine katkı sağlamaktadır (43). Çalışmamızda oda havasında bulunan ratlarla karşılaştırıldığında, hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratların akciğer dokusunda IL-10 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek bulunmuştur. Literatürde IL-10'un preterm bebeklerde BPD gelişimindeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olup, sonuçları çelişkilidir (28). Bazı çalışmalarda yaşamın ilk gününde kan ve trakeal aspirat örneklerinde IL-10 düzeylerinin yüksek (116), bazılarında ise düşük olduğu bildirilmiştir (117). IL-10, term bebeklerin solunum yolu sekresyonlarında bulunmasına rağmen, preterm bebeklerin sekresyonlarında saptanamamış ve bu durum preterm bebeklerde akciğer makrofajlarının IL-10 üretme yetersizliğiyle açıklanmıştır (118). Başka bir çalışmada ise, ventile edilen prematüre bebeklerin trakeal aspirat örneklerinde erken dönemde IL-10 olduğu tespit edilsede, BPD ile ilişkisi tam olarak ortaya çıkarılamamıştır (119). Çalışmamızda IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

İki yüzyıl boyunca, oksijenin özellikle akciğer dokusu için toksik bir bileşik olduğu bildirilmiş olup, yakın tarihli çalışmalarda yenidoğan sıçanlarda %50 veya daha fazla oksijene maruziyetin, pulmoner gelişimi ve DNA sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (120). BPD gelişiminde yüksek oksijen konsantrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin önemli bir yeri vardır (24). Yüksek oksijen, oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türleri nedeniyle toksiktir. Hiperoksi durumunda açığa çıkan serbest oksijen radikalleri özellikle O₂⁻ (süperoksit anyon), H₂O₂ (hidrojen peroksit) ve OH⁻ (hidroksil radikali), proteinler, lipidler ve DNA gibi molekülleri etkileyerek protein oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açmaktadır. Hiperoksik hasarlanma distal hava yollarındaki dallanmayı baskılayarak, gelişimin duraklamasına neden olmaktadır (102).

Yenidoğanlarda özellikle prematüre bebeklerde yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalma sonucunda reaktif oksijen/reaktif nitrojen ürünleri artmakta ve oksidan strese artış olmaktadır (9). Term bebeklere göre prematüre bebeklerin hücre içi antioksidan savunma mekanizmaları da yetersiz olup term bebeklerde oksidatif stres sonrası antioksidan enzimler indüklenebildiği halde prematüre bebeklerde bu uyarılma da yetersiz kalmaktadır.

Oksidatif stresin çeşitli yenidoğan hastalıklarının patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir ve yenidoğanlarda oksidatif stresin belirtileri ve teşhisi hakkında daha fazla bilgiye ve araştırmaya ihtiyaç vardır. Giuffre ve ark. (121) yenidoğanlarda glutatyon, lipid hidroperoksitleri ve ısı şok proteini şaperon 60'ın oksidatif stres için işlevsel ve tanısal önemi olabileceğini belirtmiştir. El-Mazary ve ark. (122) hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanlarda glutatyon peroksidaz ürünü ve antioksidan savunmada önem taşıyan selenyumun normal sağlıklı yenidoğanlara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Mukhopadhyay ve ark. (123) konjenital malformasyonlu ve sağlıklı yenidoğanları karşılaştırdığı çalışmada, konjenital malformasyonlu yenidoğanlarda C vitamini ve glutatyon gibi antioksidanlarının düzeylerinin azaldığını ve serum MDA ve protein karbonil düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Kumar ve ark. (124) plazma ve beyin omurilik sıvısı MDA düzeylerinin artmasının perinatal asfiksi ile ilişkili olduğunu iddia etmiştir. Yenidoğanlardaki oksidatif stres belirteçleri ile İUGG arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada antioksidan enzim (SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz) aktiviteleri ve antioksidanların seviyeleri ölçülmüş ve İUGG grubunda enzim aktivitesi düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur (125). Marseglia ve ark. (126) hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyaran, inflamasyon ve oksidatif stres ile ilgili önemli bir adipositokin olan visfatinin preterm yenidoğanlarda oksidatif stresin yeni bir markırı olabileceğini göstermiştir.

Biz de çalışmamızda hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturulan ratlarda lipid peroksidasyon ürünü MDA ve oksidatif stres belirteci TAS, TOS ve OSİ düzeyleri ve bunlara bosentanın etkisini inceledik.

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özellikle hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, serbest oksijen radikalleri ile kolayca reaksiyona girer ve lipid

peroksidasyonu meydana gelir. Membran akışkanlığını sağlayan bu doymamış yağ asitlerinin hasarı sonucu akışkanlıkta azalma olur. MDA, oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve lipid hasarının önemli bir göstergesidir (97).

Doğumda sağlıklı yenidoğanlarda serum lipidlerinin peroksidasyon potansiyeli yüksektir. BPD'nin serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonunun bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (127). Yüksek oksijen konsantrasyonunun RDS ve BPD gibi hastalıklarda lipid peroksit üretimine etkisi bilinmemektedir.

Bronküpulmoner displazi patogeneğinde oksidatif stres sonucu MDA düzeyinin arttığını gösteren pek çok çalışma yanında Falciglia ve ark.'nın (128) çalışmasında olduğu gibi lipid peroksidasyonu ile BPD arasında ilişki bulamadıklarını ve lipid peroksidasyonun BPD gelişiminde rol oynadığına dair bir kanıt tespit edemediklerini belirten çalışmalarda bulunmaktadır. Bu çalışmanın kısıtlılıkları PUFA (poliunsature yağ asitleri) gibi lipid peroksidasyon reaksiyonunun tüm bileşenlerinin ölçülmemesi ayrıca lipid peroksidasyonunu önleyen diğer antioksidanların (seruloplasmin gibi) da değerlendirilmemesidir. Ek olarak yayınlarda ölçülen MDA'nın lipid peroksidasyonunu ölçmek için yeterince duyarlı olmayabileceğini belirtmektedirler. Bizim çalışmamızda da MDA düzeyi bakımından HAH oluşturulan gruplarla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Şengül ve ark.'nın (6) çalışmasında iskemi/reperfüzyon (IR) grubunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanmış. Ovaryumda artmış MDA seviyeleri, lipid peroksidasyonu artışının, doku hasarını ve antioksidan savunma mekanizmalarının aşırı serbest radikal oluşumunu önlemede yetersizliğini işaret etmektedir. Bu çalışmada, MDA düzeyinin bosentan uygulanan grupta anlamlı şekilde düştüğü gösterilmiş ve bosentanın lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu düşünülmüştür. I/R hasarının lipid peroksidasyonunu ve MDA'yı arttırdığını bildiren başka çalışmalar da mevcuttur (129). Başka bir çalışmada, parasetamol ile indüklenen akut karaciğer hasarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer hasarı oluşturulan grupta MDA düzeyinin belirgin şekilde arttığı; bosentan verilen gruplarda ise MDA düzeyinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Bu etkinin bosentanın potansiyel antioksidan

etkisine bağı olabileceği düşünölmektedir. Bosentanın organ hasarına karşı birçok koruyucu özelliği olduğu başka çalışmalarda da gösterilmiştir (130). Bizim alışmamızda ise bosentan verilen gruplarda MDA düzeylerinde herhangi bir azalma saptanmamıştır.

BPD'nin etiyolojisi net bilinmemekle birlikte, patogeneizde oksidan/antioksidan sistemin önemi giderek artmaktadır (102). BPD patofizyolojisinde oksidatif stresin rolünün anlaşılması, uygun önleme stratejilerinin ve yeni tedavi yaklaşımlarının tasarlanması için önem taşımaktadır. Fetüsün doğum esnasında nispeten hipoksik ortamdan hiperoksik bir ortama hızlı bir şekilde geçişi oksidatif strese neden olmaktadır. Bununla birlikte, oksidan savunma mekanizmaları gebeliğin son dönemlerinde artmakta (80), prematüre bebekler bu oksidatif strese karşı daha savunmasız kalmaktadır. Antioksidan savunma sisteminleri iyi gelişmemiş olan preterm bebeklerde, düşük oksijen konsantrasyonları bile önemli oksidan strese neden olmaktadır.

Erel tarafından geliştirilen bir ölçüm yöntemi olan TAS, serumdaki enzimatik olan ve olmayan tüm antioksidanların durumunu gösterebilmektedir. Bu yöntemle özellikle protein, lipid, DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarına neden olan serbest radikal reaksiyonlarına karşı olan TAS seviyesi ölçölmektedir. Farklı oksidanların ve antioksidanların ayrı ayrı ölçümleri pratik olmadığından alışmamızda Erel tarafından geliştirilen ve günümüzde en popüler metotlar olarak kabul edilen yöntemlerle total antioksidan ve total oksidan kapasite çalışıldı (91,92).

Özdemir ve ark.'nın çalışmasında hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda oksidatif stres ve inflamasyonu azaltan dekspantenol tedavisi uygulanmış gruplar arasında TAS düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. TOS düzeyi hiperoksi grubunda anlamlı şekilde yüksek, hiperoksi uygulanarak dekspantenol verilen grupta düşük saptanmıştır (131).

Dizdar ve ark.'nın çalışmasında RDS'li bebeklerde sürfaktan öncesi ve sürfaktan sonrası TAS veya TOS düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada 28 haftadan küçük doğan bebekler 28 hafta ve daha büyük bebeklerle karşılaştırıldığında TAS seviyeleri <28 hafta bebeklerde düşük bulunmuş olup, antioksidan savunma sisteminin bu preterm bebeklerde olgunlaşmadığı ileri sürölmüştür. TOS düzeyleri bakımından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık

saptanmamıştır. TAS veya TOS düzeyleri ile bronkopulmoner displazi veya araştırma döneminde belirlenen diğer komplikasyonların gelişimi arasında bir ilişki saptanmamıştır (132).

Doise ve ark.'nın çalışmasında (133) sepsisli hastalarda plazma TAS düzeyinin hastalığın başlangıcında sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, hayatta kalan sepsisli hastalarda plazma antioksidan düzeyinin normal düzeylere veya normalin üzerine çıktığı, fakat ölen hastalarda TAS düzeyinin düşük seyrettiği gösterilmiştir.

Literatürde bosentanın oksidatif stres markırı olarak TAS ve TOS üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Bizim çalışmamızda antioksidan kapasiteyi yansıtan TAS düzeyi, gruplar arasında en yüksek oda havası+bosentan grubunda saptanmış olup, hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan gruplarda anlamlı düşük bulunmuştur. Oksidatif stres belirteci olan TOS düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptandı, ancak farklılık sadece oda havasında bosentan verilen grupta, geç bosentan tedavisi verilen gruba göre yüksekti. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. OSİ düzeyleri bakımından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak, bu çalışmada hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda; BPD etiopatogenezinde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin önemli rolünün olduğu, bosentanın proinflamatuvar sitokin IL-6 ve TNF- α 'yı azalttığı, antiinflamatuvar etkisiyle hiperoksik akciğer hasarını önlemede etkili olduğu histopatolojik olarak gösterildi. Ancak BPD tedavisinde bosentanın etkinliğini ve klinik kullanımını destekleyecek daha geniş 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. ($p<0.05$).
2. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda alveol yüzey alanı skoru, fibrozis skoru ve SMA skoru oda havasında tutulanlara göre belirgin olarak daha yüksekti ($p<0.01$).
3. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda bosentan tedavisinin kontrol grubuna göre alveol yüzey alanı skoru, fibrozis skoru ve SMA skorunu düşürdüğü ($p<0.01$), erken bosentan tedavisinin sadece SMA skorunu azalttığı görüldü ($p < 0.01$).
4. Proinflamatuvar sitokin IL-1 β düzeyleri hiperoksiye maruz bırakılan grupta daha yüksek bulundu, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). IL-6 ve TNF- α düzeyleri hiperoksiye maruz bırakılan grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p < 0.01$).
5. Hiperoksiye maruz bırakılan gruplarda bosentanın hem erken hem geç tedavi grubunda proinflamatuvar sitokin düzeylerini azalttığı görüldü, ancak bu azalma TNF- α ve IL-6 düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.01$), IL-1 β düzeyi için anlamlı saptanmadı ($p>0.05$).
6. IL-10 düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).
7. TAS düzeyi, gruplar arasında en yüksek oda havası+bosentan grubunda saptanmış olup, hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan gruplarda anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$).
8. TOS düzeyi sadece oda havasında bosentan verilen grupta, geç bosentan tedavisi verilen gruba göre yüksekti. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu.

9. OSİ ve MDA düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

10. Bu sonuçlarla bosentanın hiperoksik akciğer hasarı modeli ile BPD oluşturulan ratlarda IL-6 ve TNF- α 'yı azaltarak, antiinflamatuvar etkisiyle histopatolojik düzelme sağladığı görüldü.

KAYNAKLAR

1. Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. N Engl J Med 1967;276:357-68.
2. Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. Semin Neonatol 2003;8(1):63-71.
3. Arsan S, Toygar A.K, Oğuz S. Türk neonatoloji derneği bronkopulmoner displazi korunma ve izlem rehberi:2018.
4. Pusey VA, Macpherson RI, Chernick V. Pulmonary fibroplasia following prolonged artificial ventilation of the newborn infants. Can Med Assoc J 1969;100(10):451-57.
5. Van Marter LJ. Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. Curr Opin Pediatr 2005;17(2):174-80.
6. Şengül O. Blockade of endothelin receptors with bosentan limits ischaemia/reperfusion-induced injury in rat ovaries. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2013;170(2):458-63.
7. Serafim KGG, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2015; 388(11):1211-21.
8. Afyouni NE, Halili H, Moslemi F, Nematbakhsh M. Preventive role of endothelin antagonist on kidney ischemia: reperfusion injury in male and female rats. Int J Prev Med 2015;23(6):128.

9. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(7):1723-29.
10. Bancalari EH, Jobe AH. The respiratory course of extremely preterm infants: a dilemma for diagnosis and terminology. *J Pediatr* 2012;161(4):585-88.
11. Stevenson DK, Wright LL, Lemons JA, Oh W, Korones SB, Papile LA, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1632-39.
12. Lemons JA, Bauer CR, Oh W. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics* 2001;107:1.
13. Shah PS, Sankaran K, Aziz K, et al. Outcomes of preterm infants <29 weeks gestation over 10-year period in Canada: a cause for concern? *J Perinatol* 2012; 32:132.
14. Stroustrup A, Trasande L. Epidemiological characteristics and resource use in neonates with bronchopulmonary dysplasia:1993-2006.*Pediatrics* 2010;126:291.
15. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* 2007; 357:1946.
16. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003;8:73-81.
17. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 2006;89(4):313-22.

18. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 1998; 29(7):710-17.
19. Thompson A, Bhandari V. Pulmonary biomarkers of bronchopulmonary dysplasia. *Biomark Insights* 2008;3:361-73.
20. Bose CL, Dammann CE, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:455-61.
21. Li YH, Tullus K. Microbial infection and inflammation in the development of chronic lung disease of prematurity. *Microbes Infect* 2002;4:723-32.
22. Merritt TA, Deming DD, Boynton BR. The 'new' bronchopulmonary dysplasia: challenges and commentary. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(6):345-57.
23. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006;30:171-78.
24. Bancalari EH, Walsh MC. Bronchopulmonary dysplasia. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine diseases of the fetus and infant* 10 th Ed. St.Louis: Elsevier Mosby 2015:1157-69.
25. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol* 2003;8:18-27.
26. Bhandari V, Bizzarro MJ, Shetty A, Zhong X, Page GP, Zhang H, et al. Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics* 2006;117(6):1901-06.

27. Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, O'Shea TM, Allred EN, Karna P, et al. Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* 2009;124(3):450-8.
28. De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 2001;160:457-63.
29. Ballard AR, Mallett LH, Pruszynski JE, Cantey JB. Chorioamnionitis and subsequent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth weight infants: a 25-year cohort. *J Perinatol* 2016;36(12):1045-104.
30. 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):403-7.
31. Tang JR, Karumanchi SA, Seedorf G, Markham N, Abman SH. Excess soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in amniotic fluid impairs lung growth in rats: linking preeclampsia with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302(1):36-46.
32. Torchin H, Ancel PY, Goffinet F, Hascoët JM, Truffert P, Tran D et al. Placental complications and bronchopulmonary dysplasia: EPIPAGE-2 cohort study. *Pediatrics* 2016;137(3): 2015-163.
33. Isayama T, Shah PS, Ye XY, Dunn M, Da Silva O, Alvaro R, et al. Adverse impact of maternal cigarette smoking on preterm infants: a population-based cohort study. *Am J Perinatol* 2015;32(12):1105-11.
34. Singh SP, Gundavarapu S, Smith KR, Chand HS, Saeed AI, Mishra NC, et al. Gestational exposure of mice to secondhand cigarette smoke causes

bronchopulmonary dysplasia blocked by the nicotinic receptor antagonist mecamylamine. *Environ Health Perspect* 2013;21(8):957-64.

35. Minoo P. Transcriptional regulation of lung development: emergence of specificity. *Respir Res* 2000;1:109-15.
36. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2010;126(3): 443-56.
37. Perrone S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Neonatol* 2012;1(3):109–14.
38. Jobe AH, Hillman N, Polglase G, Kramer BW, Kallapur S, Pillow J. Injury and inflammation from resuscitation of the preterm infant. *Neonatology* 2008;94(3):190-6.
39. Thekkeveedu RK, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology. *Respir Med.* 2017;132:170-7.
40. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:354-62.
41. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Lerner-Geva L, Reichman B. Outcome of early-onset sepsis in a national cohort of very low birth weight infants. *Pediatrics* 2010;125(4):736-40.
42. Groneck P, Schmale J, Soditt V, et al. Bronchoalveolar inflammation following airway infection in preterm infants with chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:331-8.

43. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, 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;39:966-75.
44. Van Marter LJ, Leviton A, Allred EN, Pagano M, Kuban KC. Hydration during the first days of life and the risk of bronchopulmonary dysplasia in low birth weight infants. *J Pediatr* 1990;116:942-9.
45. Dani C, Poggi C. Nutrition and bronchopulmonary dysplasia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(3):37-40.
46. Merrill JD, Ballard RA, Cnaan A, Hibbs AM, Godinez RI. Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants. *Pediatr Res* 2004;56(6):918-26.
47. 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):320-4.
48. Fawke J, Lum S, Kirkby J, Hennessy E, Marlow N, Rowell V, et al. Lung function and respiratory symptoms at 11 years in children born extremely preterm: the EPICure study. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(2):237-45.
49. Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary dysplasia: chronic lung disease of infancy and long-term pulmonary outcomes. *J Clin Med* 2017;6(1):4.
50. Trittmann JK, Nelin LD, Klebanoff MA. Bronchopulmonary dysplasia a neurodevelopmental outcome in extremely preterm neonates. *Eur J Pediatr* 2013;172(9):1173-80.

51. Bui CB, Pang MA, Sehgal A, Theda C, Lao JC, Berger PJ, et al. Pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *J Reprod Immunol* 2017;124:21-9.
52. Levy PT, Dioneda B, Holland MR, Sekarski TJ, Lee CK, Mathur A, et al. Right ventricular function in preterm and term neonates: reference values for right ventricle areas and fractional area of change. *J Am Soc Echocardiogr* 2015; 28(5):559-9.
53. Hwang JS, Rehan VK. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia: pathophysiology, prevention and treatment. *Lung* 2018;196(2):129-38.
54. Fischer HS, Bühner C. Avoiding endotracheal ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis. *Pediatrics* 2013;132(5):1351-60.
55. Biniwale M, Wertheimer F. Decrease in delivery room intubation rates after use of nasal intermittent positive pressure ventilation in the delivery room for resuscitation of very low birth weight infants. *Resuscitation* 2017;116:33-8.
56. Kugelman A, Feferkorn I, Riskin A, Chistyakov I, Kaufman B, Bader D. Nasal intermittent mandatory ventilation versus nasal continuous positive airway pressure for respiratory distress syndrome: a randomized, controlled, prospective study. *J Pediatr* 2007;150(5):521-6.
57. Wheeler K, Klingenberg C, McCallion N, Morley CJ, Davis PG. Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in the neonate. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;11:CD003666.
58. Ballard RA, Keller RL, Black DM, Ballard PL, Merrill JD, et al. and the TOLSURF Study Group. Randomized Trial of Late Surfactant Treatment in Ventilated Preterm Infants Receiving inhaled Nitric Oxide. *J Pediatr* 2016; 168: 23-9.

59. Nieves FF, Chernick V. Bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). *Clin Pediatr* 2002;41:77-85.
60. Saugstad OD, Aune D. Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies. *Neonatology* 2014;105:55-63.
61. Schmidt B, Roberts RS, Fanaroff A, Davis P, Kirpalani HM, Nwaesei C and the TIPP investigators. Indomethacin prophylaxis, patent ductus arteriosus and the risk of bronchopulmonary dysplasia: further analyses from the trial of indomethacin prophylaxis in preterms (TIPP). *J Pediatr* 2006;148:730-4.
62. Bell EF, Acarregui MJ. Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (1): CD000503.
63. Tin W, Wiswell TE. Adjunctive therapies in chronic lung disease: examining the evidence. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:44-5.
64. Doyle LW, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Early (<8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017:CD001146.
65. Doyle LW, Cheong JLY. Postnatal corticosteroids to prevent or treat bronchopulmonary dysplasia e Who might benefit? *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2017;22:290-5.
66. Doyle LW, Cheong JL, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Late (>7 days) systemic postnatal corticosteroids for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017:CD001145.

67. Bassler D, Halliday HL, Plavka R, Hallman M, Shinwell ES, Jarreau PH, et al. Early inhaled budesonide for the prevention of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 2015;373:1497-506.
68. Darlow BA, Graham PJ. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short-and long-term morbidity in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(10):CD000501.
69. Meyer S, Gortner L. NeoVitA Trial Investigators. Early postnatal additional highdose oral vitamin A supplementation versus placebo for 28 days for preventing bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Neonatology* 2014;105:182-8.
70. Barrington KJ, Finer N, Pennaforte T. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017:CD000509.
71. Ballard HO, Anstead MI, Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. *Respir Res* 2007;8(1):41.
72. Tin W, Wiswell TE. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia: debunking the myths. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14(6):383-90.
73. Ng G, da Silva O, Ohlsson A. Bronchodilators for the prevention and treatment of chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2012:CD003214.
74. Howlett A, Ohlsson A, Plakkal N. Inositol in preterm infants at risk for or having respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2015:CD000366.
75. Levine CR, Gewolb IH, Davis JM, et al. The safety, pharmacokinetics, and antiinflammatory effects of intratracheal recombinant human Clara cell protein

in premature infants with respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 2005;58:15-21.

76. Augustine S, Avey MT, Harrison B, Locke T, Ghannad M, Moher D, et al. Mesenchymal stromal cell therapy in bronchopulmonary dysplasia: systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:2079-93.
77. Yeh TF, Chen CM, Wu SY, Husan Z, Li TC, Hsieh WS, et al. Intratracheal administration of budesonide/surfactant to prevent bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:86-95.
78. Qanungo S, Mukherjea M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;215:11-9.
79. V. Bhandari, J.A. Elias. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radic Biol Med* 2006;41(1):4–18.
80. T.M. Asikainen, C.W. White. Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203(2):177–88.
81. Halliwell B, 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;639-45.
82. Yapar SB, Eskiocak S. Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi (Uzmanlık Tezi). Edirne: Trakya Üniversitesi; 2006.

- 83.** 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):673-80.
- 84.** Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985;248: 550-6.
- 85.** Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loffler BM, Burri K, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Experiment Therapeutics* 1994;270:228-35.
- 86.** Andrasi TB, Kekesi V, Blazovics A, Dobi I, Szabo G, Juhasz-Nagy A. ET(A) receptor blockade protects the small intestine against ischaemia/reperfusion injury in dogs via an enhancement of antioxidant defences. *Clinical Sci* 2002; 148:59-63.
- 87.** Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 1998;275(1):110-7.
- 88.** 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):538-48.
- 89.** 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.
- 90.** 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):12-8.

91. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-85.
92. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-11.
93. Demirbag R, Gur M, Yilmaz R, Kunt AS, Erel O, Andac MH. Influence of oxidative stress on the development of collateral circulation in total coronary occlusions. *Int J Cardiol* 2007;116(1):14-9.
94. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 2014:69-73.
95. Sarıcı SÜ. Bronkopulmoner displazi: tanımı, patogenezi, epidemiyolojisi ve patolojisinde yeni görüşler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006;49:60-70.
96. Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative Stres Markers. *Anti-Aging Medicine* 2010;7(5):36-44.
97. Gönül E. Yenidoğan sıçanlarda omega-3 yağ asitlerinin hiperoksik akciğer hasarı üzerine etkileri (Uzmanlık Tezi). İstanbul: GATA/Haydarpaşa Eğitim Hastanesi; 2013.
98. Demir K, Kumral A, Duman N, Sarioglu S, Yılmaz O, Yesilirmak DC, et al. Clarithromycin, montelukast, and pentoxifylline combination treatment ameliorates experimental neonatal hyperoxyic lung injury. *J Maternal Fetal Neonatal Med* 2008;21(6):407-13.

99. Öncel MY, Yurttutan S, Alyamaç Dizdar E. Beneficial Effect of Etanercept on Hyperoxic Lung Injury Model in Neonatal Rats. *J Invest Surg* 2016;29(1):1-5.
100. Özdemir ÖM, Gözkeser E, Bir F, Yenisey Ç. The effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Pediatr Neonatol* 2014 ;55(5):352-7.
101. Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie II, Truog WE. Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics* 2000;106:1452-9.
102. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003;8:39-49.
103. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factorbeta1: tale of a strained relationship. *Matrix Biol* 2015;47:54-65.
104. Parada C, Li J, Iwata J, Suzuki A, Chai Y. CTGF mediates smad dependent transforming growth factor beta signaling to regulate mesenchymal cell proliferation during palate development. *Mol Cell Biol* 2013;33(17):3482-93.
105. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin. *System Am J Pathol* 2000;157:1863-74.
106. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, et al. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest* 2004;114:1308-16.
107. Chilakapati SR, Serasanambati M, Vissavajjhala P, Kanala JR, Chilakapati DR. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model by a

combination therapy of bosentan and imatinib. *Exp Lung Res* 2015;41(4):173-88.

- 108.** Weng C.M, Yu C.C, Kuo M.L, Chen B. C, Lin C. H. Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts by ETAR dependent JNK/AP-1 pathway. *Biochem Pharmacol* 2014;88:402-11.
- 109.** 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):330-40.
- 110.** Jónsson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:198–201.
- 111.** Cayabyab RG, Jones CA, Kwong KY. Interleukin-1beta in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;14:205-211.
- 112.** Patterson AM, Taciak V, Lovchik J. Ureaplasma urealyticum respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:321-8.
- 113.** Yeager ME, Belchenko DD, Nguyen CM. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:14–22.
- 114.** Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, Pecetti G, Galeazzi M. Evaluation of the effect of bosentan treatment on proinflammatory cytokine

serum levels in patients affected by systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24:261–264.

- 115.** Chen Y, Hanaoka M, Droma Y, Chen P, Voelkel NF, Kubo K. Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. *Eur Respir J* 2010;35:904-12.
- 116.** Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R, Herva R, Kaukola T, Hallman M. Blood cytokines during the perinatal period in very premature infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2009;154:39.
- 117.** Jónsson B, Li YH, Noack G, Brauner A, Tullus K. Down regulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infants with chronic lung disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000;89:1375.
- 118.** Blahnik MJ, Ramanathan R, Riley CR, Mino P. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates. *Pediatr Res* 2001;50:726.
- 119.** McColm J, Stenson B, Biermasz N, McIntosh N. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:156-69.
- 120.** Wilborn AM, Evers LB, Canada AT. Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species. *Pediatr Res* 1996;40:225-32.
- 121.** Giuffre M, Rizzo M, Scaturro G, Pitruzzella A, Marino Gammazza A, Cappello F, et al. Oxidative stress markers at birth: Analyses of a neonatal population. *Acta Histochem* 2015;117(4-5):486-91.

122. El-Mazary AA, Abdel-Aziz RA, Mahmoud RA, El-Said MA, Mohammed NR. Correlations between maternal and neonatal serum selenium levels in full term neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr* 2015;41:83.
123. Mukhopadhyay B, Gongopadhyay AN, Rani A, Gavel R, Mishra SP. Free radicals and antioxidants status in neonates with congenital malformation. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 2015;20(4):179-83.
124. Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR. Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatric Neurology* 2008;38(3):181-5.
125. Hracsko Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS. Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intrauterine growth retardation. *Redox Report*, 2008;13(1):11-6.
126. Marseglia L, D'Angelo G, Manti M. Visfatin: new marker of oxidative stress in preterm newborns. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016;29(1):23-9.
127. Cruz ML, Bhadra S, Subbiah MT, Tsang RC. Serum lipid peroxidation potential in infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:1212-15.
128. Falciglia HS, Johnson JR, Sullivan J, Hall CF, Miller JD, Riechmann GC, Falciglia GA. Role of antioxidant nutrients and lipid peroxidation in premature infants with respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *Am J Perinatol* 2003;20(2):97-107.
129. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:183-8.

- 130.** Xu H, Lin L, Yuan WJ. Antiarrhythmic effect of endothelin-A receptor antagonist on acute ischemic arrhythmia in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:37-44.
- 131.** Özdemir R, Demirtaş G, Parlakpınar H, Polat A, Tanbağ K, Taşlıdere E, Karadağ A. Dexpanthenol therapy reduces lung damage in a hyperoxic lung injury in neonatal rats. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(11):1801-07.
- 132.** Dizdar EA, Uras N, Oguz S, Erdeve O, Sari FN, Aydemir C, Dilmen U. Total antioxidant capacity and total oxidant status after surfactant treatment in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Ann Clin Biochem* 2011;48:462-7.
- 133.** Doise JM, Aho LS, Quenot JP, Guillard JC, Zeller M, Vergely C, et al. Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:203-9.