

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

**YENİDOĞAN RATLARDA HİPEROKSİYLE İNDÜKLENMİŞ
AKCİĞER HASARINDA SUBKUTAN ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FETHİ BAŞTAN**

**DANIŞMAN
PROF.DR. ÖZMERT M. A. ÖZDEMİR**

DENİZLİ -2025

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

**YENİDOĞAN RATLARDA HİPEROKSİYLE İNDÜKLENMİŞ
AKCİĞER HASARINDA SUBKUTAN ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FETHİ BAŞTAN**

**DANIŞMAN
PROF.DR. ÖZMERT M. A. ÖZDEMİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 05.06.2024 tarih ve
2024TIPF011 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2025

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın en başından beri bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yaşadığım çeşitli sorunlarda desteklerini esirgemeyerek çözüm bulmamı sağlayan danışman hocam ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanım Prof. Dr. Özmert M. A. ÖZDEMİR'e,

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman yanımda olan, klinik bilgi ve tecrübeleriyle eğitimime büyük katkı sağlayan tüm saygıdeğer hocalarıma,

Zorlu eğitim süreci boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve her zaman desteklerini gördüğüm yan dal uzmanlarıma,

Tez boyunca desteklerini esirgemeyen PAÜ Tıbbi Patoloji, PAÜ Tıbbi Biyoloji ve PAÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana hep destek olan annem Hatice BAŞTAN ve babam Yakar BAŞTAN'a

TEŞEKKÜR EDERİM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
TANIM.....	3
TARİHÇE.....	4
GÖRÜLME SIKLIĞI.....	5
PATO FİZYOLOJİ	5
Normal Akciğer Gelişimi.....	5
Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patolojisi.....	7
RİSK FAKTÖRLERİ.....	8
PATOGENEZ	8
Klinik Bulgular ve Prognoz.....	10
KORUNMA VE TEDAVİ.....	11
KÖK HÜCRE (KH) VE KH-KAYNAKLI TEDAVİLER	13
MATERYAL VE METOD.....	16
DENEY HAYVANLARI	16
BPD MODELİNİN OLUŞTURULMASI	16
ANNE SÜTÜ ÖRNEĞİ VE EKSOZOM İZOLASYONU	18
AKCİĞER DOKU ÖRNEĞİNDE EKSOZOMLARIN VARLIĞININ BELİRLENMESİ.....	19
HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER.....	19
BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	21
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	22
BULGULAR.....	23
BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	23

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	25
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR.....	36
KAYNAKLAR	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

BPD:	Bronkopulmoner Displazi
CMV:	Sitomegalovirüs
CPAP:	Devamlı Pozitif Havayolu Basıncı
eNOS:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
EPC:	Endotel Progenitör Hücreler
EV:	Ekstraselüler Veziküller
GİS:	Gastrointestinal Sistem
HAH:	Hiperoksik Akciğer Hasarı
haPDA:	Hemodinamik Anlamlı PDA
HIF-1 α :	Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör 1 Alfa
HIV:	İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
IL:	İnterlökin
ILV:	İntralüminal Veziküller
iNO:	İnhale Nitrik Oksit
İVK:	İntraventriküler Kanama
KH:	Kök Hücre
MV:	Mekanik Ventilasyon
MVC:	Multiveziküler Cisim
NEK:	Nekrotizan Enterokolit
NICHD:	Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
OSİ:	Oksidatif Stres İndeksi

PDA:	Patent Duktus Arteriyozus
PDGFA:	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü-a Polipeptidi
PEEP:	Pozitif Ekspirasyon Sonu Basıncı
RBP:	Retinol Binding Protein
RDS:	Respiratuvar Distress Sendromu
ROP:	Prematüre Retinopatisi
TAS:	Total Antioksidan Kapasite
TGF- β :	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TND:	Türk Neonatoloji Derneği
TNF- α :	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TOS:	Total Oksidan Kapasite
VEGF:	Vasküler Endotelial Growth Faktör
YYBÜ:	Yenidoğan Yoğunbakım Ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Akciğer gelişim evreleri, eski-yeni BPD.....	6
Şekil 2 Pleksiglastan imal edilen kapalı alanda deney düzeneği.....	17
Şekil 3 Deneyde kullanılan Sprague-Dawley rat yavruları.....	17
Şekil 4 Akciğer doku örneklerinde eksozom varlığının gösterilmesi..	19
Şekil 5 Torakotomi ile akciğer dokusunun çıkarılması.....	22
Şekil 6 Akciğer dokularında fibrozisin değerlendirilmesi.....	28
Şekil 7 Akciğer dokularında SMA boyama değerlendirilmesi.....	29
Şekil 8 Akciğer dokularında alveol yüzey alanı değerlendirilmesi.....	30
Şekil 9 X4 büyütmede H&E boyamada grup 2 ve 4.....	31

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 BPD sınıflandırması.....	4
Tablo 2 Akciğerlerin fetal ve embriyonal gelişim evreleri.....	7
Tablo 3 Akciğer dokularında TAS ve TOS değerleri.....	23
Tablo 4 Kan örneklerinde TAS ve TOS değerleri.....	24
Tablo 5 Kan ve akciğer örneklerinde OSİ değerleri.....	25
Tablo 6 Akciğer dokularında alveolar yüzey alanı, fibrozis ve düz kas aktin skoru	26
Tablo 7 Akciğer dokularında alveolar yüzey alanı ve düz kas aktin skoru değerleri, ikili karşılaştırmalar.....	27

ÖZET

Yenidoğan ratlarda hiperoksiyle indüklenmiş akciğer hasarında subkutan anne sütü eksozomunun etkileri

Dr. Fethi BAŞTAN

Prematüre bebekleri etkileyen en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden birisi olan bronkopulmoner displazi (BPD) için, etkinliği kanıtlanmış kesin bir tedavi veya önleyici strateji henüz mevcut değildir. Biz bu çalışmada subkutan anne sütü eksozomunun, hiperoksik akciğer hasarı (HAH) yöntemiyle BPD modeli oluşturduğumuz yenidoğan ratların akciğerlerinde meydana getirdiği histopatolojik ve biyokimyasal etkilerini araştırmayı planladık. HAH oluşturulacak Sprague-Dawley rat yavruları postnatal birinci günden yedinci güne kadar, pleksiglastan imal edilen kapalı bir alanda hiperoksiye (oksijen konsantrasyonu %85) maruz bırakıldı. Oksijen konsantrasyonu günde iki defa kontrol edildi (anestezik gaz monitörü, Drager, 1996) ve nem oranı %60-80 arasında tutulmaya çalışıldı. Oluşan karbondioksitin soda-lime ile ortamdan uzaklaştırılması sağlandı.

Rat yavruları her birinde sekiz adet olmak üzere altı gruba ayrıldı. Grup I (oda havası, kontrol grubu, n=8), Grup II (HAH modeli, n=8), Grup III (profilaksi plasebo grubu, HAH+1.-6. günler subkutan salin uygulandı, n=8), Grup IV (profilaksi tedavi grubu, HAH+1.-6. günler subkutan anne sütü eksozomu uygulandı, n=8), Grup V (plasebo tedavi grubu, HAH+7.-11. günler subkutan salin uygulandı, n=8), Grup VI (tedavi grubu, HAH+7.-11. günler anne sütü eksozomu uygulandı, n=8). Grup I, II, III ve grup IV postnatal 7. günde, grup V ve VI ise 11. günde ötenazi edildi. Ötenazi sonrası ratların sağ akciğer doku örneklerinde alveolar yüzey alanı skoru, fibrozis ve düz kas aktin skoru değerlendirildi. Sol akciğer doku örnekleri total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS) düzeyleri için ticari ELISA kitleri ile ve kardiyak girişimle alınan kanda ticari ELISA kitleri ile TAS ve TOS düzeyleri antijen antikor reaksiyonuna dayalı sandviç immün ölçüm yöntemi ile Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında analize edildi.

HAH modelinde hem akciğer alveolar yüzey alanı skoru hem de düz kas aktin skoru kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanmış ($p<0,05$), ancak fibrozis bakımından farklılık gösterilememiştir ($p>0,05$). TOS düzeyleri hem akciğer dokusu

hem de kanda HAH grubunda kontrol grubuna göre yine yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Anne sütü eksozomunun profilaktik uygulanması hem akciğer alveolar yüzey alanı skorunu hem de düz kas aktin skorunu Grup II, III, V ve VI'ya göre belirgin olarak düşürmüştür ($p<0,05$) ve kontrol grubuyla aralarında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca profilaktik anne sütü eksozom uygulamasının akciğer dokusu TOS düzeylerini de hem HAH grubu hem de plasebo grubuna göre belirgin düşürdüğü görülmüştür ($p<0,05$).

Sonuç olarak, hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan bu deneysel çalışmada profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak akciğer hasarını önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda özellikle erken tanı ve önleyici stratejiler üzerinde durulmaktadır, bu yönüyle önleyici bir tedavi yöntemi olarak anne sütü eksozomunun BPD gelişme ihtimali yüksek olan bebeklere profilaktik olarak uygulanması bakımından çalışmamızın önemli olduğunu, ancak bu alanda daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü eksozomu, hiperoksik akciğer hasarı, tedavi

SUMMARY

The effects of subcutaneous breast milk exosome on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats

Dr. Fethi BAŞTAN

Bronchopulmonary dysplasia (BPD), which is one of the most important causes of morbidity and mortality affecting premature infants, has no proven treatment or preventive strategy. In this study, we planned to investigate the histopathologic and biochemical effects of subcutaneous breast milk exosome in the lungs of neonatal rats in which BPD was induced by hyperoxic lung injury (HLI). Sprague-Dawley rat pups in which HLI was induced were exposed to hyperoxia (oxygen concentration 85%) in a closed space made of plexiglass from postnatal day one to postnatal day seven. Oxygen concentration was checked twice a day (anesthetic gas monitor, Dräger, 1996) and humidity was kept between 60-80%. Carbon dioxide was removed from the environment with soda-lime.

Rat pups were divided into six groups of eight in each. Group I (room air, control group, n=8), Group II (HLI model, n=8), Group III (prophylaxis placebo group, HLI+1.-6. days subcutaneous saline administered, n=8), Group IV (prophylaxis treatment group, HLI+1.-6. days, subcutaneous breast milk exosome administered n=8), Group V (placebo treatment group, HLI+7.-11. days, subcutaneous saline administered, n=8), Group VI (treatment group, HLI+7.-11. days, subcutaneous breast milk exosome administered, n=8). Groups I, II, III and IV were euthanized on postnatal day 7, and groups V and VI on postnatal day 11. After euthanasia, alveolar surface area score, fibrosis and smooth muscle actin score were evaluated in the right lung tissue samples of the rats. Left lung tissue samples were analyzed for total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant capacity (TOC) levels with commercial ELISA kits, and TAC and TOC levels in blood obtained by cardiac intervention with commercial ELISA kits were analyzed by antigen antibody reaction based sandwich immunoassay method in the Medical Biochemistry Research Laboratory.

Both lung alveolar surface area score and smooth muscle actin score were significantly higher in the HLI model compared to the control group ($p < 0.05$), but no difference was found in terms of fibrosis ($p > 0.05$). TOC levels in both lung tissue and

blood were found to be higher in the HLI group compared to the control group, but not statistically significant. Prophylactic administration of breast milk exosome significantly decreased both lung alveolar surface area score and smooth muscle actin score compared to groups II, III, V and VI ($p < 0.05$) and no statistical difference was found between the prophylactic treatment group and the control group. In addition, prophylactic breast milk exosome administration significantly decreased lung tissue TOS levels compared to both HLI group and placebo group ($p < 0.05$).

In conclusion, in this experimental study in which hyperoxic lung injury and BPD model were established, it was shown that prophylactic breast milk exosome administration has a preventive effect on lung injury both histopathologically and biochemically. In recent years, especially early diagnosis and preventive strategies have been emphasized. In this respect, we think that our study is important in terms of prophylactic administration of breast milk exosome as a preventive treatment method to infants with a high probability of developing BPD, but more comprehensive and further studies are needed in this field.

Keywords: Breast milk exosome, hyperoxia-induced lung injury, treatment

GİRİŞ VE AMAÇ

Bronkopulmoner displazi (BPD), uzun süre yüksek oksijen konsantrasyonu ve yüksek basınçlı mekanik ventilasyon uygulanan yenidoğanlarda görülen kronik bir akciğer hastalığıdır. Yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ve adölesan gebelikler ile birlikte prematüre doğumlar artmış, buna karşın teknolojik ve bilimsel gelişme ile birlikte bebeklerin sağkalım oranları artmış, ancak BPD daha sık görülen bir hastalık haline gelmiştir. BPD gelişen infantlarda hipoksi, hiperkapni, takipne, yardımcı solunum kaslarının kullanımı, kilo almada azalma, apne, kalp yetmezliği bulguları (hepatomegali, ödem) izlenmekte, hastalık kronikleştikçe pulmoner hipertansiyon gelişmektedir. Bronkopulmoner displazi gelişmesinin önüne geçilmesi, hastalık gelişti ise uygun bir biçimde tedavi edilmesi; mortaliteyi azaltmakta, bebeğin yaşam kalitesinde iyileşme sağlayarak hem tıbbi açıdan hem de ekonomik açıdan fayda sağlamaktadır (1).

BPD insidansını azaltmak için çeşitli korunma ve tedavi stratejileri mevcuttur. Fakat küçük prematürelere akciğerler çok immatürdür ve hasara açıktır. Bu nedenle BPD gelişimi tamamen önlenememekte ve kesin bir tedavisi bulunmamaktadır.

Kök hücre (KH) ve KH-kaynaklı tedaviler plastisite ve rejenerasyon yeteneği yüksek organlar düşünüldüğünde ümit verici bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir. Kök hücrelerin özellikleri arasında köken aldığı hücreye ya da başka özelleşmiş hücrelere dönüşebilmek, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olmak, uygulandığı dokuya fonksiyonel destek sağlayabilmek, sınırsızca bölünebilmek sayılabilir. Bazı neonatal hastalıklar için (intraventricüler kanama “İVK”, bronkopulmoner displazi, nekrotizan enterokolit “NEK”, vb) yapılan deneysel bazı hayvan modellerinde KH'lerin yararlı olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (2).

Bir nevi kök hücre görevi gören ekstraselüler veziküller (EV) prokaryotik ve ökaryotik hücrelerden hücre dışı ortama salınırlar. Bu salınma fizyolojik ve patolojik koşullarda olabilmektedir. EV'lerin çapları 20-10.000 nm arasında değişmektedir. EV'ler tüm vücut sıvılarında (anne sütü, idrar, kan ve beyin omurilik sıvısı) bulunabilmektedir. Görevleri arasında hücreler arası iletişim sağlamak, hücreyel homeostazın devamı, fonksiyonel biyomoleküllerin transfer edilmesi yer almaktadır.

EV'lerin üç çeşit biyotipi vardır, bunlar eksozomlar, mikro veziküller ve apoptotik cisimlerdir. EV'ler insan anne sütünde ilk defa 1980'lerde elektron mikroskobu yardımıyla saptanmıştır. Süt EV'leri izole etme yöntemleri arasında ultrasantrifüjleme, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, ticari çökeltme kitleri ve boyut dışlama kromatografisi gibi yöntemler vardır. Süt kaynaklı EV'ler koagülasyonda, bağırsak epitel fonksiyon düzenlenmesinde, anti-viral aktivitede ve bağırsak mikrobiyomu üzerinde rol oynar (3).

Tıbbi alanda son zamanlarda sağlanan teknolojik ve bilimsel gelişmeler, düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşam şanslarını arttırmış, ancak bununla birlikte bu bebeklerde uzun dönemde, İVK, NEK, BPD ve prematüre retinopatisi (ROP) gibi morbiditelerin de görülme sıklığı artmıştır. BPD, özellikle 1000 gram ve altında doğan prematüre bebeklerde daha sık görülen multifaktöriyel bir kronik akciğer hastalığıdır. BPD gelişiminin önlenmesi ya da BPD olmuş bebeklerin optimal tedavisi konusunda önemli gelişmeler olmakla birlikte hastalığın patogenezinin tam olarak anlaşılması, önlenmesi ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Biz de bu çalışmamızda, insan anne sütü eksozomlarının, prematüreleri etkileyen önemli bir hastalık olan BPD'yi önlemede ya da bu hastalığın tedavisinde etkili olup olmadığını rat yavrularında oluşturulan BPD modeli ile parenteral olarak uyguladığımız anne sütü eksozomunun histopatolojik ve biyokimyasal etkilerine bakarak araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Bronkopulmoner displazi, uzun süre yüksek oksijen konsantrasyonu ve yüksek basınçlı mekanik ventilasyon uygulanan yenidoğanlarda görülen kronik bir akciğer hastalığıdır (4). Doğum salonunda başlayan ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (YYBÜ) devam eden, prematüre bebek bakımı ve tedavi süreçlerini ilgilendiren ve günümüzde oldukça yaygın uygulamalara dönüşen birçok yenilik sayesinde ROP, NEK ve İVK gibi prematüre bebeklerde görülen hastalıkların sıklıklarında ve tedavilerinde önemli değişiklikler görülmeye başlamıştır. Buna karşın, bu gruptan BPD sıklığında bir azalma sağlanamamıştır. Yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşması ve adölesan gebelikler ile birlikte giderek daha da azalan gebelik haftalarında doğan prematüre doğumların artması, yenidoğan yoğun bakım alanında son yıllarda yaşanan gelişmeler ile bebeklerin sağkalım oranının artması ile birlikte BPD daha sık görülen bir hastalık haline gelmiştir. BPD gelişen infantlarda hipoksi, hiperkapni, takipne, yardımcı solunum kaslarının kullanımı, kilo almada azalma, apne, kalp yetmezliği bulguları (hepatomegali, ödem) izlenmekte, hastalık kronikleştikçe pulmoner hipertansiyon gelişmektedir. Bu hastalarda akciğer enfeksiyonları, gastroözefageal reflü sık görülmektedir. Hastalarda inflamasyon nedeni ile artan hava yolu direnci, bronşiyal hiperreaktivite ve sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonları ağır pulmoner morbiditeye yol açmaktadır (5). BPD hastanede yatış sürecinde ve taburculuk sonrasında ciddi bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bronkopulmoner displazi gelişmesinin önüne geçilmesi, hastalık gelişti ise zamanında ve uygun şekilde tedavisi; mortaliteyi azaltmakta, bebeğin yaşam kalitesini artırmakta, tıbbi ve ekonomik yükü azaltmaktadır.

TANIM

Bronkopulmoner displazi, ilk kez 1967 yılında Northway ve arkadaşları tarafından çoğunlukla respiratuar distres sendromu (RDS) nedeniyle entübe edilmiş prematüre bebeklerin fibrozisle karakterize kronik akciğer hastalığı olarak tanımlanmıştır (6). Daha sonraları ise çok daha düşük gebelik haftasındaki prematüre bebeklerin yaşam oranı artmış ve BPD bu bebeklerde alveoler ve pulmoner vasküler gelişiminin erken doğum ve devamındaki süreçlerden olumsuz etkilenmesi sonucu ortaya çıkan "yeni" bir hastalık olarak ele alınmaya başlanmıştır. Günümüzde, Jobe ve

Bancaları'nın 2001 Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Institutes of Health, "NIH") Çalıştay'ında önerdikleri BPD tanım ve sınıflaması hastalığın tanımında yaygın olarak kullanılmakta, bu tanım ve sınıflama Türk Neonatoloji Derneği Bronkopulmoner Displazi Korunma ve İzlem Rehberi 2018 güncellemesinde de aynı şekilde yer almaktadır (1, 7, Tablo 1)

Tablo 1. BPD sınıflandırması (1)

	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) Ek O ₂ gereksinimi olmaması	En az 28 gün ≥%21 O ₂ gereksinimi + postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) Ek O ₂ gereksinimi olmaması
Orta BPD	PM 36. hafta veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <%30 ek O ₂ gereksiniminin olması	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) <%30 ek O ₂ gereksiniminin olması
Ağır BPD	PM 36. hafta veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) ≥%30 O ₂ gereksinimi ve/veya pozitif basınç (PBV veya nCPAP gereksinimi)	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha erkense) ≥%30 O ₂ gereksinimi ve/veya pozitif basınç (PBV veya nCPAP gereksinimi)

PBV: pozitif basınçlı ventilasyon, nCPAP: nazal sürekli pozitif hava yolu basıncı

TARİHÇE

Klasik BPD tanımı 1967'de ilk olarak Northway ve arkadaşları (6) tarafından yapılmıştır. 1969'da Pusey ve arkadaşları yenidoğanlarda RDS olmamasına rağmen uzun süren mekanik ventilasyon nedeniyle gelişen yaygın interstisyel fibroplaziyi tanımlamışlardır ve BPD için mutlaka RDS olması gerektiğini göstermişlerdir (8). BPD, oksijen gereksinimi 28 günden fazla süren ve minimum üç gün mekanik ventilasyona gereksinim duyan yenidoğanlarda radyolojik olarak akciğer bulguları olan ve artmış solunum eforu ile giden solunum yetmezliği olarak Bancaları ve arkadaşları tarafından 1979'da tekrar tanımlanmıştır (9). Prematüre bir yenidoğanın postnatal birinci haftasından BPD tanısı aldığı zamana kadarki yaklaşık yirmi bir günlük sürede, solunum desteği ihtiyacının devam ettiğini belirten Bancaları ve Jobe

tarafından BPD için yeni bir tanımlama önerilmiştir. Bahsedilen solunum desteği ihtiyacının çeşitli risk faktörlerine (obstrüksiyon, apne, patent duktus arteriozus “PDA”, sepsis gibi) bağlı olabileceği belirtilmiş ve bu durum “prematürenin solunumsal instabilitesi” terimiyle tanımlanmıştır (10).

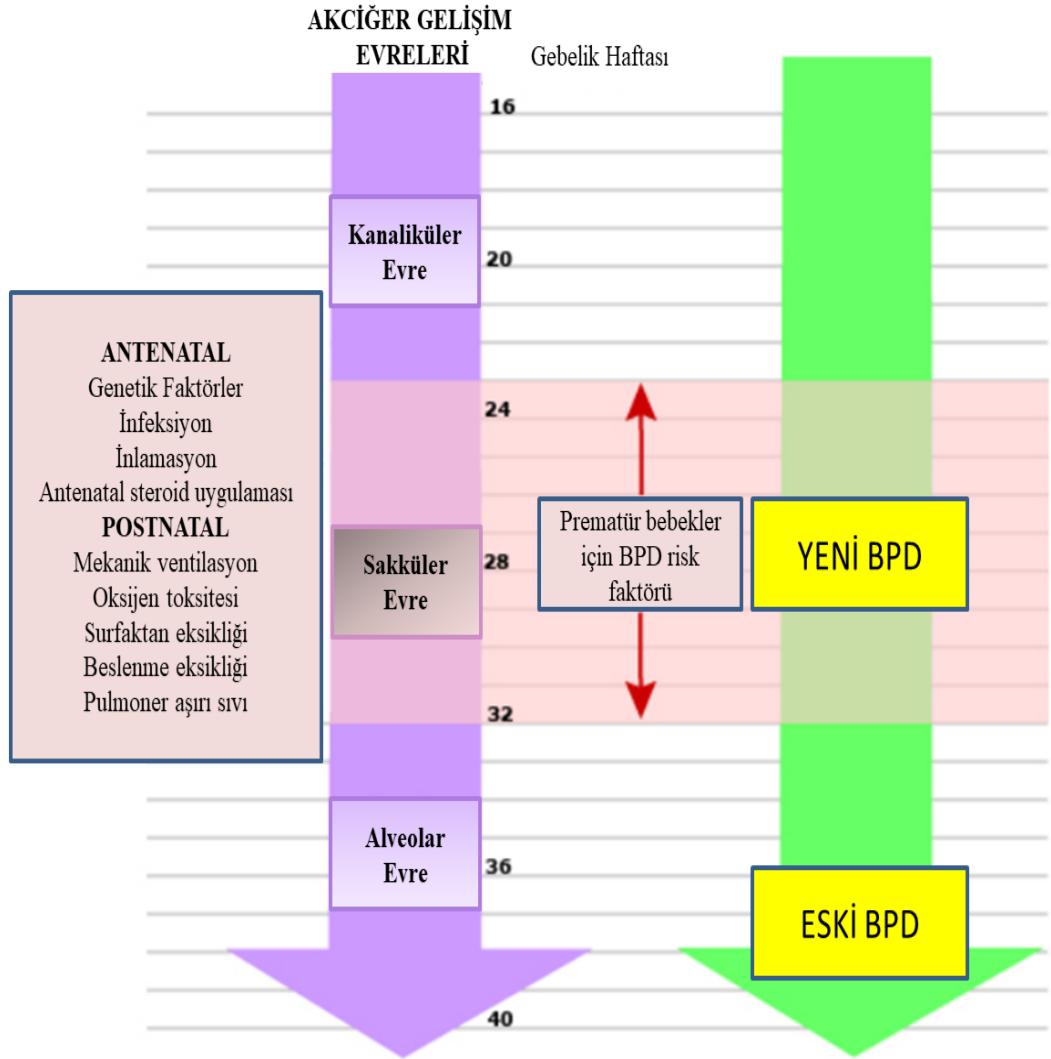
GÖRÜLME SIKLIĞI

Son zamanlarda prematüre doğumların ve prematüre bebeklerin sağkalım oranının artması ile birlikte BPD daha sık görülen bir hastalık haline gelmiştir. Gebelik haftası ve doğumdaki vücut ağırlığı ile BPD sıklığı arasında ters orantı mevcuttur. Farklı yenidoğan ünitelerinde farklı BPD tanımlarının kullanılması da BPD sıklığında değişikliklere neden olabilmektedir. 1993-1994 senelerinde Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü'nün (NICHD) raporuna göre; prematüre yenidoğanlarda 36. postmentstrüel haftada oksijen ihtiyacı tanımına göre BPD sıklığının yaklaşık %19 olduğu belirtilmektedir. 1995-1996'da yapılan çalışmalarda ise 1500 gramdan daha küçük prematüre yenidoğanlarda BPD sıklığı %23'tür (11,12). NICHD'nin çalışmasına göre doğum ağırlığı 501-750 gram olan prematürelere BPD sıklığı %52, doğum ağırlığı 751-1000 gram olanlarda %34, doğum ağırlığı 1001-1200 gram olanlara %15, doğum ağırlığı 1201-1500 gram olanlarda ise %7 olarak bildirilmiştir (12).

PATOFİZYOLOJİ

Normal Akciğer Gelişimi

Akciğerlerin gelişim basamakları beş evreden oluşmaktadır. Postnatal dönemde bu gelişim evreleri devam etmektedir (Tablo 2) (13). Şekil-1'de fetal ve embriyonel dönemde akciğer gelişim evreleri gösterilmektedir (13). Akciğerlerin hasara en duyarlı olduğu dönem sürfaktan azlığı, kompliyans ve antioksidan mekanizmaların zayıflığı, destekleyici yapılarda zayıflık ve sıvı klirensinde azlık görülen sakküler evredir (23-32.hafta) (14).



Şekil 1. Akciğer gelişim evreleri, eski-yeni BPD (13, 14).

Tablo 2. Akciğerlerin fetal ve embriyonal gelişim evreleri (13, 15)

Embriyonel Evre (konsepsiyon sonrası 26.gün-7.hafta)
Hava yolları bronkopulmoner segmentlere kadar uzanır
Psödoglandüler Evre (7.-16.hafta)
Asinüsler kadar ikili hava yolları 16-25 dallanma oluşturur
Solunum epiteli ve kıkırdak farklılaşır
Preasiner vasküler yapının damarsal gelişimi tamamlanır
Kanaliküler Evre (16. haftadan 26-28.haftaya kadar)
Terminal epiteller kübik yapı alır
Tip 2 epitel hücrelerinin farklılaşması başlar
20. hafta civarında distal pulmoner sirkulasyon gelişir
İntersitisyel doku azalır (potansiyel alveol yapıları incelir)
Sakküler Evre (26-28. haftadan 32-36.haftaya kadar)
Sakküler duvarların intersitisyel boşlukları belirgin azalır
Sonraki alveolarizasyona hazırlık
Alveoler Evre (32-36. haftadan postnatal 2 yaşa kadar)
Asiner yapı kompleksleşir, kapillerlerle birleşir, alveoller oluşur

Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patolojisi

BPD hastalarının otopsi bulguları yeni tedaviler sonrasında değişmiştir (15). Akciğer yüzey alanının, damarlanmanın artışı, alveolo-kapiller bariyerde incelmeye, akciğerlerde gaz değişiminin etkili olması için gereklidir. Bu değişimler akciğerin sakküler ve alveolar evresinde oluşur (16). Eski BPD’de hava yollarının düz kaslarında hiperplazi, skuamöz metaplazi, alveollerde fibrozis, fibroproliferasyon, pulmoner arter hipertansiyonuna bağlı bulgular ve alveol yüzey alanında azalma mevcuttur. Yeni BPD ise alveollerde hipoplazi, asiner kompleks ve vasküler yatak azalması, dismorfizm, değişen miktarlarda hava yollarının düz kaslarında hiperplazi ve intersitisyel fibroproliferasyon ile eski BPD’yle karşılaştırıldığında daha hafif arteriyel ve arteriolar lezyonlar ile karakterizedir (17).

RİSK FAKTÖRLERİ

BPD gelişimi açısından risk faktörleri olarak öncelikle prematürite/immatürite, mekanik ventilasyon, oksijen toksitesi üzerinde durulmakla birlikte, prenatal enfeksiyon, bazı maternal faktörler (gebelikte sigara içilmesi, annede hipertansiyon ve intrauterin büyüme kısıtlılığı), şiddetli RDS, patent duktus arteriyozus (PDA), akciğer ödemi, erkek cinsiyet ve genetik gibi başka risk faktörleri de mevcuttur (18). Bu faktörler akciğerde akut hasara neden olmakta ve bunun sonucunda akciğerde yapısal ve fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (19).

PATOGENEZ

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin %65 kadarında hemodinamik anlamlı PDA (haPDA) saptanmakta ve soldan sağa şant yoluyla akciğer kanlanmasını ve ödemi arttıracak, bu durumun da akciğer hasarını arttırarak mekanik ventilatör (MV) gereksinimine yol açabileceği bildirilmektedir (1).

Hüresel düzeyde serbest oksijen radikalleri ile antioksidan defans arasında ince bir denge bulunmaktadır. Serbest radikaller en dış halkalarında ekstra elektronları olan ve canlı dokulara zarar veren moleküllerdir. Yapılan çalışmalar serbest oksijen radikallerinin BPD patogenezinde rol aldığını göstermektedir (20,21). Hiperoksi, reperfüzyon veya inflamasyon durumlarında serbest radikal üretimi artmaktadır. Antioksidan defans sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda da serbest radikal üretimi artar. Prematürel serbest radikal hasarına özellikle duyarlıdır, çünkü antioksidan konsantrasyonları doğum anında yeterli değildir. İnsan ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, oksijen tedavisinin BPD gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Yüksek oksijen saturasyon değerlerinin hiçbir avantajı olmadığı gibi yüksek oksijen konsantrasyonu serbest radikaller yoluyla akciğer hasarına sebep olabilmektedir. Akut ya da kronik solunum yetmezliği olan yenidoğanlarda optimum arteriyel oksijen saturasyon aralığının ne olması gerektiği henüz net olarak bilinmemektedir (22, 23).

Beslenme akciğer gelişimi ve matürasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. BPD'li hastalarda malnütrisyon (%30-65) sıklıktır. BPD'li hastanın kalori ihtiyacı normalden %20-25 daha fazladır. Malnütrisyonun akciğer fonksiyonları üzerine

olumsuz birçok etkisi vardır. Prematüre bebeklerin enerji rezervlerinin çok düşük olmasının yanında gastrointestinal problemler, sepsis, kullanılan ilaçların yan etkileri (metilksantinler veya steroidler) solunum durumlarındaki her bir bozulma beslenme rejimlerinin sekteye uğramasına sebep olmaktadır (24).

BPD gelişiminde sürfaktan protein genlerindeki bazı polimorfizm ve mutasyonların da etkili olabileceği belirtilmektedir (25). Genetik yatkınlık BPD patogenezinde rol oynayabilmektedir.

Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve büyüme faktörü eksikliği gibi nedenlerle fetal akciğerlerde büyüme kısıtlanması olması nedeniyle intrauterin gelişme geriliğinin BPD oluşmasında risk faktörü olduğu düşünülmektedir (26).

Gebeliğin hipertansif hastalıklarında (preeklampsi, eklampsi vb) salınan bazı mediatörler nedeniyle pulmoner damar gelişiminin olumsuz etkilenmesi ve bunun akciğer gelişiminde olumsuz etkileri olabileceği bildirilmiştir (27). Fakat bu konuda kesin bir kanıt saptanmamıştır.

Maternal sigara kullanımının BPD gelişimine etkisini araştıran çalışmalarda maternal sigara kullanımının preterm bebeklerde BPD riskini artırdığı gösterilmiştir (28).

Prematürelilik ise BPD için en önemli risk faktörüdür. Embriyonal akciğer tomurcukları “*transcription factor / hepatocyte nuclear factor-3β*” aktivitesiyle kontrol edilmektedir. Alveol epitelyum hücrelerinden salınan VEGF damar yapılanmasını uyarır. Endotel hücrelerinin büyümesinin ve farklılaşmasının stimülasyonunu sağlar. VEGF inhibisyonuna neden olan herhangi bir etki akciğer damarlanmasını sekteye uğratar. Transforme edici büyüme faktörü-beta'nın (TGF-β) pulmoner gelişimde inhibitör etkisi mevcuttur (29). Prenatal pulmoner gelişimin 26-28. gebelik haftalarına denk gelen kanaliküler safhasında veya bu safhadan daha önce hipoksiye maruziyet, ya da doğumun gerçekleşmesi pulmoner gelişimi olumsuz etkiler ve pulmoner hipoplaziye benzer durum meydana getirir. Pulmoner gelişimin sakküler evresinde ya da bu evrenin sonrasında meydana gelen pulmoner hasarlarda olumsuz etkiler daha hafif olmaktadır (30).

Postnatal ventilatör ile solunum desteği, BPD gelişimine neden olabilecek akciğer hasarından sorumlu olabilen önemli faktörlerden birisidir. BPD'nin önlenmesinde en önemli strateji yeterli gaz değişimini sağlayacak minimum solunum desteğinin verilmesidir. İnvazif ventilasyonun neden olduğu volutravma, BPD gelişiminde oldukça önemlidir. Bu yüzden invazif mekanik ventilasyon uygulanan prematürelde aşırı tidal volümden kaçınılmalıdır (31). Akciğer hasarı açısından riskli prematüre bebeklerde solunum desteği başlangıcı için en az invazif yöntem olan nazal continue positive airway pressure (nCPAP) kullanılmalıdır.

BPD insidansında artışa sebep olan bir diğer neden de sepsistir (32). Postnatal enfeksiyonlar BPD için önemli etkenlerdir. Antenatal inflamasyonların BPD gelişimine etkisi daha azdır. İnterlökin-6 (IL-6), IL-8, IL-1 β ve *tumour necrosis factor-alpha* (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivitelerinde artış ve antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 aktivitesinin az olmasının da BPD açısından önemli olabileceği düşünülmektedir (33).

Postnatal dönemde sürfaktan yetersizliği de BPD gelişiminde etki gösterebilir. Solunum desteği alan ventilatöre bağlı 68 prematüre yenidoğanla yapılan bir çalışmada, trakeal aspirat örneklerinin %75'inde yüzey geriliminde düşüklük saptamıştır ve bu örneklerde sürfaktan proteinlerinin de değişik oranlarda azaldığı gösterilmiştir (34). Bu bulgular uzun süre mekanik ventilatöre bağlı prematüre yenidoğanlarda sürfaktan fonksiyonlarında bozulma ya da sürfaktan eksikliği olabildiğini ve BPD gelişiminde rol oynayabildiğini göstermektedir.

Adrenal yetmezlikli yenidoğanlarda da PDA ve akciğer hasarı insidansında artma olduğu bildirilmektedir (35).

Sonuç itibarıyla prematüre bebeklerde, sepsis, mekanik ventilatör, PDA, hiperoksi, beslenme ve genetik yatkınlık da dahil olmak üzere BPD gelişiminde pek çok faktörün etkili olduğu görülmektedir.

Klinik Bulgular ve Prognoz

Prematüre doğan bir bebekte postnatal birkaç hafta geçmesine rağmen solunum sıkıntısı bulguları, oksijen ve solunum desteği devam ediyorsa mutlaka BPD olabileceği düşünülmelidir. Türk Neonatoloji Derneği BPD Korunma ve İzlem

Rehberi 2018 güncellemesi tanı kriterlerine göre değerlendirilerek tanısal yaklaşım sağlanmalıdır (1).

BPD geçiren çocukların pulmoner fonksiyonlarında anormallikler saptanabilmektedir. Bir çalışmada, BPD geçiren prematüre bebeklerde solunum morbiditedesinde artışın devam ettiği gösterilmiştir (36). BPD'nin ayrıca astım riskinde artışa neden olduğu da bildirilmektedir(37).

BPD gelişimi, bu bebeklerde nörolojik olarak da olumsuz etkilere neden olmaktadır. Mikrosefali, serebral palsi gibi etkileri olmakta ve kognitif fonksiyonlar ve dil gelişiminde geriliklere neden olabilmektedir (38).

BPD geçiren aynı zamanda pulmoner hipertansiyon ve kardiyak bozukluklara da yatkın olmaktadır. BPD'ye pulmoner hipertansiyonun da eklenmesi durumunda morbidite ve mortalitede belirgin artış meydana gelmektedir (39).

KORUNMA VE TEDAVİ

BPD insidansını azaltmak için çeşitli korunma ve tedavi stratejileri mevcuttur. Fakat küçük prematürelere akciğerler çok immatürdür ve hasara açıktır. Bu nedenle BPD gelişimi tamamen önlenememekte ve kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Doğum sonrası solunum desteği ile akciğer hasarı, BPD gelişiminde çok önemli bir role sahiptir. Prematüre bebeklerde BPD riskinin azaltılabilmesi için bebeğin mümkünse hiç entübe edilmemesi ve mekanik ventilatöre hiç bağlanmaması gerekir. Küçük prematürelere doğum salonunda spontan solunum varsa, düşük O₂ konsantrasyonu (%21-30) ile başlanan ve ölçülebilen "positive end expiratory pressure (PEEP)" (5-8 cmH₂O) ile erken nCPAP uygulanması önerilir (40, 41). Bu şekilde fizyolojik bir fonksiyonel rezidüel kapasite ve oksijenasyon sağlanmaya çalışılırken, surfaktan inaktivasyonunun en aza indirilmesi mümkün olabilir. Ancak bazı bebeklerde solunum çabası invazif olmayan solunum desteğine karşın yetersiz kalır ve entübe edilerek mekanik ventilasyonda izlenmesi gerekebilir. İnvazif mekanik ventilasyon ise endotravma, barotravma, volüt travma ve atelektotravmaya bağlı olarak akciğer hasarını arttırır.

Bir çalışmada gebelik yaşı ≤ 28 hafta ve postnatal 7-14. günleri arasında, invazif MV desteği yanında, inhale nitrik oksit (iNO) tedavisi de alan prematüre bebeklerde,

toplam beş doza kadar çoklu surfaktan tedavisi verilmiş, bu tedavinin 36-40. haftalarında BPD'nin azalmadığı gösterilmiştir (42).

Prematüre apnesinde kullanılan metilksantinler, özellikle kafeinin erken dönemde ve proflaktik kullanımının prematüre bebeklerde hafif/orta BPD sıklığını azaltabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır, ancak uzun dönem sonuçlarıyla ilgili ek çalışmalara ihtiyaç vardır (43-45).

İnflamasyonun BPD patogeneğinde önemli bir rolü vardır. Steroidler anti-inflamatuar etkilerine ilave olarak, sürfaktan üretimini arttırmakta, hava yolu ödemi azaltmaktadır. Steroidler ayrıca kapiller kaçağı stabilize edip, beta-adrenerjik aktiviteyi arttırmakta ve total akciğer fibrozisini azaltmaktadırlar. Bu etkileri sayesinde pulmoner fonksiyonları ve gaz değişimini düzelterek ekstübasyonu kolaylaştırmakta ve sonuç olarak BPD gelişimini engelleyebilmektedirler (46). Steroidin etkisi; tedaviye başlama zamanı (çok erken, erken, geç), steroid kullanma süresi, total doz ve kullanılan steroid tipine (deksametazon veya hidrokortizon) bağlıdır. BPD tedavisinde steroidlerin birçok merkezde farklı şekilde kullanılmasına rağmen kısa dönemdeki etkileri tartışmalıdır. İn hale steroidlerin mortalite, BPD, ventilatör veya O₂ tedavi süresi üzerine etkisi saptanamamıştır (47). Postnatal steroidlerin serebral palsiyi arttırıcı etkilerinden dolayı çok erken (ilk 96 saat) dönemde kullanılmaması önerilmektedir. BPD veya uzun süre mekanik ventilatör tedavisi de serebral palsy için artmış bir risk oluşturmaktadır. Steroid kullanımı sırasında hiperglisemi, gastrointestinal perforasyon, hipertansiyon, enfeksiyon, steroide bağlı kardiyomiyopati ve büyüme geriliği gibi komplikasyonların geliştiği bildirilen diğer yan etkilerdir. Steroidlerin kısa ve uzun süreli yan etkileri dikkate alındığında her hastaya rutin uygulanabilecek kadar masum olmadıklarını söylemek doğru olacaktır (47).

Vitamin A hem güçlü bir antioksidan olması hem de solunum yolu epiteli bütünlüğü üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle kullanılmaktadır. Fakat 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 (48).

Nitrik oksitin alveoler ve vasküler gelişimde rol oynaması ve eksikliğinin BPD'ye neden olabilmesi sebebiyle BPD'nin önlenmesi için iNO kullanılması araştırılmış, fakat bu çalışmaların sonuçları da tutarsız olarak değerlendirilmiştir. Cochrane sistematik derlemesinde iNO tedavisinin BPD'yi önleme etkisinin olmadığı bildirilmiştir (49).

KÖK HÜCRE (KH) VE KH-KAYNAKLI TEDAVİLER

Kök hücre ve KH-kaynaklı tedaviler plastisite ve rejenerasyon yeteneği yüksek organlar düşünüldüğünde ümit verici bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir. Kök hücrelerin özellikleri arasında köken aldığı hücreye ya da başka özelleşmiş hücrelere dönüşebilmek, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olmak, uygulandığı dokuya fonksiyonel destek sağlayabilmek, sınırsızca bölünebilmek sayılabilir (2, 50). Bazı neonatal hastalık (İVK, BPD, NEK, vb.) modelleri ile yapılan deneysel hayvan çalışmalarında KH'lerin yararlı olabileceği gösterilmiştir (2, 51). KH'lerin etki mekanizmaları engraftman ve ekstraselüler vezikül (EV) (eksozom sekretom) aracılı parakrin mekanizmalardır (2, 50).

Ekstraselüler veziküller prokaryotik ve ökaryotik hücrelerden hücre dışı ortama salınırlar (52, 53). Bu salınma fizyolojik ve patolojik koşullarda olabilmektedir. EV'lerin çapları 20-10.000 nm arasında değişmektedir (54). EV'ler tüm vücut sıvılarında (anne sütü, idrar, kan ve beyin omurilik sıvısı) bulunabilmektedir. Görevleri arasında hücreler arası iletişim sağlamak, hücre homeostazının devamı, fonksiyonel biyomoleküllerin transfer edilmesi yer almaktadır (52-58). EV'lerin üç çeşit biyotipi vardır ve bunlar eksozomlar, mikro veziküller ve apoptotik cisimlerdir (54). Ekstraselüler proteinler, nükleik asitler, lipitler, küçük moleküller ve iyonlar hücre zarının invajinasyonu yoluyla intraselüler alana girer. Böylece erken endozom meydana gelir ya da endoplazmik retikulum, trans-golgi ağı ve mitokondri bileşenleri tarafından oluşturulan erken endozomlarla füzyon yapabilir. Erken endozomlar intraselüler etkileşimle geç endozomları meydana getirir (59-64). Endozomal zarın içe doğru invajinasyonu ile multiveziküler cisim (MVC) meydana gelir. MVC intralümenal veziküller (ILV) içerir ve multiveziküler endozom diye de bilinir. MVC içerikleri lizozomlar ve otofagozomlarla füzyon yaparak intraselüler alana salınabilir veya hücre membranıyla füzyon yoluyla ILV'ler eksozomlar halinde ekstraselüler

alana salınabilir (60, 65). EV'lerin hücreler arası iletişim ve sinyal iletimi, koagülasyon, hastalıklara karşı immünite, hücre çoğalması, apoptoz engellenmesi, endotelial hücrelerde angiyojenez indüklenmesi, doku yenilenmesi, hücre diferansiyasyonunun düzenlenmesi gibi etkileri vardır (59, 66-70). Bu ve benzeri sebeplerle EV'lerin birçok hastalığın tanı ve tedavi süreçlerinde kullanılması yaygındır (59, 70-73). Olgun dentritik hücrelerden salınan EV'ler, doğrudan CD4+ veya CD8+ T hücrelerini hedefleyip bu hücreleri aktive veya inhibe eden peptid-MHC kompleksleri sunar (71-74). Endotel progenitör hücrelerden (EPC) oluşan eksozomlar, mikrovasküler endotel hücrelerince kullanılarak vasküler onarıma fayda sağlar. EPC'den türetilen EV'ler, insan mikrovasküler endotel hücrelerinin çoğalma ve göç etme yeteneğini önemli ölçüde artırarak, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), IL-8, anjiyopoyetin-1, E-selektin, VEGF faktörü A, VEGFR-2, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α), kemokin (C-X-C motifi), ligand-16 (CXCL16), trombosit türevli büyüme faktörü-a polipeptidi (PDGFA) gibi bir dizi pro-anjiyogenik sitokinin seviyesini yükseltir (75).

Anne sütü yenidoğanların ideal beslenmesini sağlamakla birlikte sekretuar immünoglobulinler, beyaz kan hücreleri ve antimikrobiyal faktörlere (lizozimler, oligosakkaritler ve antimikrobiyal peptitler gibi) de sahiptir. Yenidoğanın immün sistemini ve gastrointestinal sistem (GİS) gelişimini destekler (76-79). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterileri içerir, bebek mikrobiyotasına etki ederek bağırsağın bariyer bütünlüğüne olumlu etki yapar, bazı antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyen oligosakkaritler içerir (78-81). Anne sütü ani bebek ölümü sendromu, NEK ve ROP insidansını azaltır (82-84). Hastane yatış oranını azaltır ve nörogelişimsel gelişime de katkı sağlar (85, 86). Metabolik sendrom ve insülin direnci de anne sütüyle beslenen bebeklerde daha az görülür (85-87). Anne sütü EV'lerde bulunan doku faktörü koagülasyonu tetikler, meme başında emmeye bağlı hasarı tamir eder (3, 88). Süt EV'lerinin intestinal epitel proliferasyonu arttırarak apoptozu azalttığı, hasar ve inflamasyonu azalttığı, kök hücre etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (89-94). Süt EV'leri, immün aktiviteyi düzenler ve human immundeficiency virüs (HIV), cytomegalo virüs (CMV) gibi virüslere karşı korur (95-98). EV'ler bu terapötik etkilerini yüzeylerine bağlı veya vezikülün içinde bulunan moleküller (DNA, RNA, proteinler, enzimler ve miRNA'lar gibi) ile gerçekleştirir ve artrit, kanser ve

osteoporoz gibi hastalıklarda da yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (99-103). Mevcut bilgilerimiz ışığında, anne sütün den elde edilen EV ile deneysel BPD modeli oluşturulan ratlara anne sütün EV'lerinin intragastrik olarak verildiği tek bir çalışmada; BPD profilaksisi veya tedavisinde EV'lerin olumlu etkilerinin olduğu gsterilmiştir (104). Bu alışma dışında literatürde başka bir çalışma şu ana kadar yayımlanmamıştır.

Tıp alanındaki teknolojik ve bilimsel gelişmeler dűřük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşama oranlarını arttırmıştır, ancak bu bebeklerde uzun dönemde ciddi morbiditeler sık gürölmektedir ve bunların en önemlilerinden birisi BPD'dir. BPD özellikle ≤ 1000 gram doğan prematüre bebeklerde daha sık gürölen multifaktöriyel bir kronik akciğer hastalığıdır. BPD gelişiminin önlenmesi ya da BPD olmuş bebeklerin optimal tedavisi konusunda önemli gelişmeler olmakla birlikte hastalığın patogenezinin anlaşılması, önlenmesi ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu maksatla çalışmamızda, anne sütün den elde edilen eksozomların, prematüre bebeklerde önemli bir sağlık sorunu olan BPD hastalığının önlenmesinde veya tedavisinde etkili olup olmadığını BPD modeli oluşturulan rat yavrularında parenteral uygulayarak histopatolojik ve biyomikyasal etkilerini araştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

DENEY HAYVANLARI

Deney için vahşi tip Sprague-Dawley rat yavrusu kullanılması planlandı. Hayvanlar hijyenik makrolon kafesler içerisinde klimalı odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda muhafaza edildi. Adlibitum olarak beslenen 48 adet rat yavrusu kullanıldı.

BPD MODELİNİN OLUŞTURULMASI

BPD modeli için Zhou Y ve arkadaşları (104) tarafından tanımlanan hiperoksi kaynaklı akciğer hasarı modeli kullanıldı. BPD modeli için rat yavruları postnatal 1. günden 7. güne kadar pleksiglastan imal edilen kapalı alanlarda hiperoksiye (oksijen konsantrasyonu %85) maruz bırakıldı. Oksijen konsantrasyonu günde iki defa kontrol edildi (anestezik gaz monitörü, Drager, 1996) ve nem oranı %60-80 arasında tutulacak şekilde ayarlandı, ayrıca ortamdaki karbondioksit soda-lime ile uzaklaştırıldı.

Rat yavruları her birinde 8 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Grup I (kontrol ya da sağlıklı grup), sağlıklı rat yavruları (ilaç veya salin verilmeyen ve BPD modeli oluşturulmayan, kontrol grubu); Grup II (BPD grubu), BPD modeli oluşturulan ama başka herhangi bir işlem uygulanmayan grup; Grup III (Profilaktik Plasebo grubu), BPD modeli oluşturulan ve 1. günden 6. güne kadar subkutan 0,1 ml salin uygulanan grup; Grup IV (Profilaktik Tedavi grubu), BPD modeli oluşturulan ve 1. günden 6. güne kadar 0,1 ml/100 µl subkutan anne sütü eksozomu (1×10^5 eksozom) uygulanan; Grup V (Plasebo Tedavi grubu), BPD modeli oluşturulan ve postnatal 7. günden 11. güne kadar subkutan 0,1 ml salin uygulanan ve Grup VI (Tedavi grubu), BPD modeli oluşturulan ve postnatal 7. günden 11. güne kadar 0,1 ml/100 µl subkutan anne sütü eksozomu (1×10^5 eksozom) uygulanan gruplar olarak oluşturuldu. Deney sonrası Grup I-IV postnatal 7. günde, Grup V ve VI ise 11. günde son dozdan 4-6 saat sonra ötenazi edildi.



Şekil 2. Pleksiglastan imal edilen kapalı alanda deney düzeneği



Şekil 3. Deneyde kullanılan Sprague-Dawley cinsi rat yavruları

ANNE SÜTÜ ÖRNEĞİ VE EKSOZOM İZOLASYONU

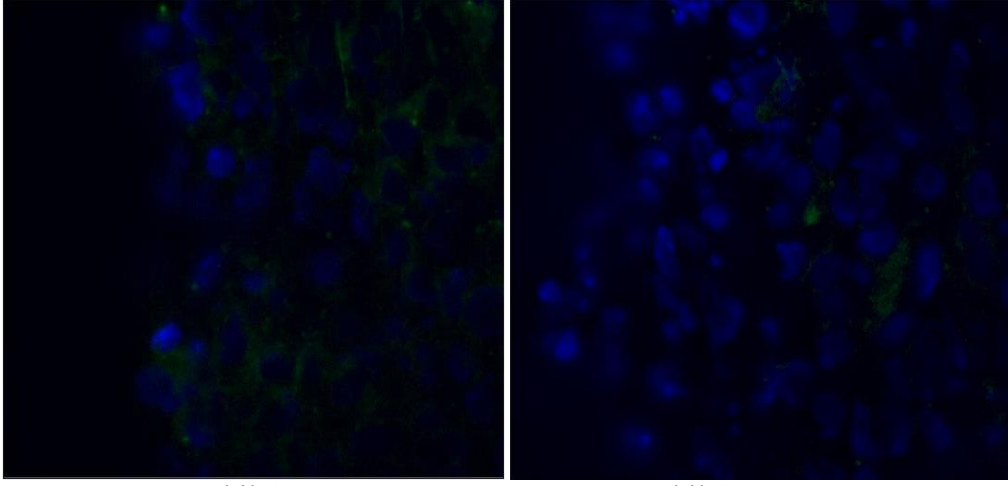
Gönüllü ve onam veren annelerden mature süt örneği alınarak eksozom izolasyonu yapıldı. Annelerden süt örneği alınma ve saklanma koşulları literatürde belirtildiği şekilde uygulandı (95). İnsan anne sütü örneklerinden eksozomları izole etmek ile ilgili uluslararası kabul gören standart bir protokolün olmaması nedeniyle, literatürde sınırlı sayıda bulunan kaynaklarda belirtilen güncel protokol olan ultrasantrifügasyon yöntemiyle eksozom elde edildi (95). Anne sütü örneklerinden eksozom izolasyonundan sonra, MISEV2018 kriterleri kapsamında eksozom karakterizasyonu yapıldı (105). Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) ile süt-kökenli eksozomların büyüklük dağılımı ve konsantrasyonları belirlendi. Bu analiz Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile yapıldı. İzole edilen eksozom örneklerinden lizatlar hazırlandı. Bu amaçla, aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmış olan lizis çalışma tamponu kullanılarak protokol uygulandı:

- I. 1x lizis tamponuna (Cell Signalling Tech.), 1µl proteaz inhibitör kokteyli (100x) (Cell Signalling Tech.) ve 1 µl EDTA (0.5 M) eklenerek toplamda 100 µl çalışma lizis tamponu elde edildi.
- II. 100 µl çalışma lizis tamponuna 100 µl eksozom örneği eklenerek homojenize edildi. Örnekler 15 dk buzda inkübe edildikten sonra, tekrar homojenize edilerek eksozomal protein lizatları hazırlandı (Bu lizatlar, eksozomların protein miktarlarının belirlenmesinde ve Western Blot analizlerinde kullanıldı).

Eksozomların protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla ticari bir kit (DC Protein Assay, BioRad) ve ticari protein standardı (Protein Standard II, BSA, BioRad) kullanıldı. Eksozomal belirteçlerin seçiminde MISEV2018 kriterleri değerlendirmeye alındı (105). Western Blot analizleri, anti-CD9, anti-CD63, anti-TSG101, anti-kalneksin, anti-β aktin primer antikorları ve HRP-konjuge sekonder antikor kullanılarak tamamlandı. Anne sütü-kökenli eksozom örnekleri ticari kit yardım ile üretici firmanın belirttiği protokole uyularak PKH26 boyası (fluoresan boya) ile işaretlendi (Sigma Aldrich).

AKCİĞER DOKU ÖRNEĞİNDE EKSOZOMLARIN VARLIĞININ BELİRLENMESİ

Fluoresan boya ile işaretlenmiş eksozom örnekleri uygulandıktan sonra rat yavruları, gruplarına göre doğum sonrası 7. veya 11. günde intraperitoneal pentobarbital sodyum (200 mg/kg) uygulanarak ötenazi edildi ve her bir rat yavrusundan alınan akciğer doku örnekleri ayrıldı. Ayrılan akciğer doku örneklerinin frozen kesitleri (10 µm kalınlıkta) alındı ve kesitler floresan mikroskopu yardımı ile analize edildi.



Şekil 4A

Şekil 4B

Şekil 4. Akciğer doku örneklerinde eksozom varlığının gösterilmesi (Floresan mikroskop ile x100 büyütmede bakılan akciğer dokusu frozen kesitlerindeki yeşil alanlar eksozom geçişini göstermektedir)

HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER

Ötenazi edilen rat yavrularının torakotomi ile açılan göğüs boşluğundan çıkarılan sağ akciğer dokusu 24 saat %10'luk tamponlanmış formaldehit çözeltisi içinde bekletildi. Rutin takip işlemlerinden sonra parafine gömülen örneklerden histopatolojik inceleme için 5 µm kalınlıkta kesitler hazırlandı. Kesitler rutin olarak Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası, histokimyasal olarak Mason-Trikrom boyası, immünohistokimyasal kas spesifik aktin boyası ile boyandı. Akciğer doku

örneklerinde alveolar yüzey alanı skoru, fibrozis ve düz kas aktin skoru değerlendirilmesi patoloji uzmanı tarafından yapıldı.

Alveol yüzey alanı semikantitatif ölçümü için H&E ile boyanan sağ akciğerlerin periferik kısımlarından seçilen rastgele 10 alan X100 büyütme ile değerlendirildi. Alveol yüzey alanı azalmasına göre derecelenme şu şekilde belirlendi(106):

Azalma yok: 0

Hafif azalma: 1

Orta azalma: 2

Belirgin azalma: 3

Fibrozis değerlendirilmesi için H&E ve Mason-Trikrom ile boyanan sağ akciğerlerin orta-alt loblarının periferinde rastgele 10 alan X100 büyütme ile incelendi. Fibrozis dereceleri şu şekilde belirlendi (107):

Fibrozis yok: 0

Hafif fibrozis: 1

Orta fibrozis: 2

Ağır fibrozis: 3

Düz kas aktin (SMA) boyaması için formalinde tespit edilmiş parafine gömülü dokulardan alınan kesitler (3 µm kalınlıkta) elektrostatik yüklü lamlarda hazırlandı ve 60 santigrat derecede etüvde minimum 2 saat kurutma işlemi uygulandı. Ventana, BenchMark XT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında bütün boyama işlemleri, antijen açığa çıkarma ve deparafinizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Hematoksilen ve mavileştirici solüsyon kullanılarak zıt boyama cihazda tamamlandı. Kesitlere dehidratasyon, ksilen ile şeffaflandırma ve lamel ile kapatma işlemleri elde yapılmak suretiyle immünohistokimya protokolünün tamamlanması sağlandı. Düz kas aktine (Clone 1A4) yönelik primer antikor 1/500 oranında dilüsyonla damlatıldı. 20 dakika süresinde inkübasyon yapıldı. Primer ve sekonder antikor için uygun olan kesitlere pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlem uygulandı. Rastgele 10 adet periferik akciğer alanı X100 büyütmede immünohistokimyasal skorlama amacıyla

seçildi. Dağılım ve yoğunluk açısından 0'dan 3'e kadar düzenlenen bir gösterge çizelgesiyle semikantitatif skrolama yapılarak pozitif boyanma derecesi değerlendirildi (108).

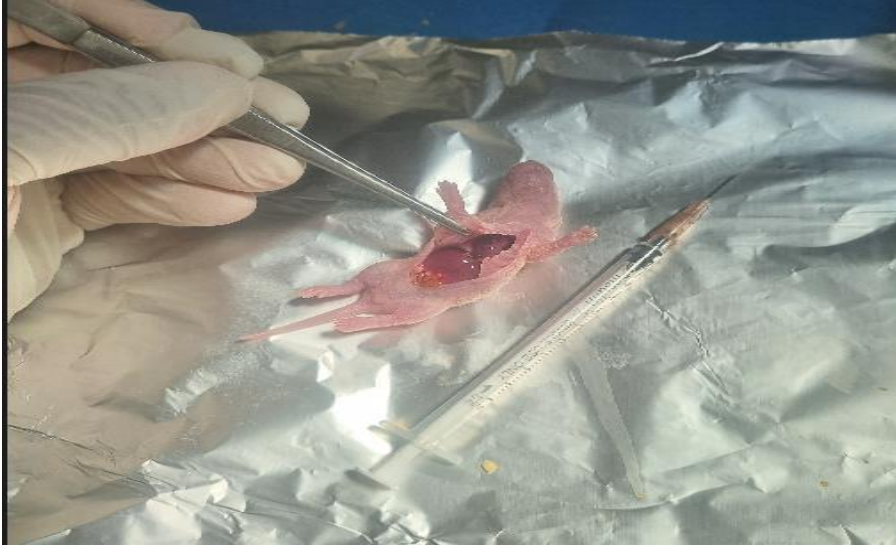
BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Alınan sol akciğer doku örnekleri fosfat tampon salin solüsyonu içine alınarak, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarına gönderilerek dokuların soğuk ortamda homojenizasyonu gerçekleştirildikten sonra en az 10 dk 3000 devirde santrifüj işlemi uygulandı. Daha sonra bu doku örneklerinden TAS ve TOS düzeyleri ticari ELISA kitleri ile biyokimya uzmanı tarafından analiz edildi. Sol akciğer dokuları alındıktan sonra sıvı nitrojen ile dondurularak hassas tartı ile tartıldı ve her 1 gr dokuya 9 ml %60 etanol olacak şekilde etanol solüsyonuna koyuldu. Biyokimyasal analizler için -80 derecede dondurularak saklandı. TAS ve TOS çalışılması için kitlerin içindeki uygun doku tamponları eklendi ve homojenitör ile homojenize edildi. Doku homojenizasyonu için fosfat tampon salin solüsyonu kullanıldı. Dokular hassas terazi ile tartıldı ve her 1 miligram dokuya 9 mikrolitre %10 fosfat tampon salin solüsyonu eklendi. Homojenizasyondan sonra 1500 g'de 60 dakika santrifüje edildi.

TAS ölçümleri için yapılan spektrofotometrik ölçümde ticari kitler kullanıldı (Elabscience). ELISA plaklarına 10 mikrolitre standart 10 mikrolitre örnek yüklendi. Kitin içinden çıkan reagent 1 her örneğe 200 mikrolitre eklendi. Elde edilen karışım 660 nm'de 37 santigrat derecede birinci okuma yapıldı. Sonra 20 mikrolitre reagent 2 konuldu. 5 dakika sonra 660 nm'de 37 santigrat derecede ikinci okuma yapıldı. Hazır standart kite göre yapılan hesaplama sonuçları mmol Trolox Eq/L birimiyle ifade edildi (109).

TOS ölçümleri için yapılan spektrofotometrik ölçümde ticari kitler kullanıldı (Elabscience). ELISA plaklarına 20 mikrolitre standart 20 mikrolitre örnek yüklendi. Kitin içinden çıkan reagent 1 her örneğe 200 mikrolitre eklendi. Elde edilen karışım 590 nm'de 37 santigrat derecede birinci okuma yapıldı. Sonra 50 mikrolitre reagent 2 konuldu. 5 dakika sonra 590 nm'de 37 santigrat derecede ikinci okuma yapıldı. Hazır standart kite göre yapılan hesaplama sonuçları mikromol H₂O₂ Eq/L birimiyle ifade edildi (110).

Ötenaziden hemen sonra rat yavrularından serum ayırıcı tüpe alınan kardiyak kan santrifüje edildi. Santrifüj sonrası ependorf tüplere ayrılan serum örnekleri -20 derece ve daha altındaki sıcaklıklarda buzdolabında saklandı ve sonrasında oda ısısında toplu olarak alınan serumlardan ticari ELISA kitleri ile TAS ve TOS düzeyleri antijen antikor reaksiyonuna dayalı sandviç immün ölçüm yöntemi ile Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda analiz edildi. Ayrıca oksidatif stres indeksi (OSİ, "TOS/TAS") değerleri de değerlendirildi.



Şekil 5. Torakotomi ile akciğer dokusunun çıkarılması

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma gruplarının biyokimyasal verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma, median ve minimum-maksimum değerler olarak verilirken, histopatolojik değerler nümerik sayı olarak verildi. Çalışma gruplarının sayısal biyokimyasal parametreleri dağılımı normal aralıkta saptanmış olup, gruplar arasındaki farklılığı belirlemede *One-way ANOVA* testi ve *Tukeypost-hoc* testi kullanılırken, histopatolojik değerlendirmede non-parametrik test (*Kruskal Wallis* ve *Benferoni* düzeltilmeli *Mann-Whitney U* testi) kullanıldı. Saptanan sonuçlar arasındaki farklılık için $P < 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel bakımdan anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizlerde SPSS (version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yazılım programı kullanıldı.

BULGULAR

Deney sonlandırıldığında Grup I ve II’de 8 adet, Grup III ve IV’de 7 adet, Grup V ve VI’da ise 6 adet, toplamda 42 adet rat yavrusuyla çalışma tamamlandı. Toplam 6 rat deney sürecinde kaybedildi.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Akciğer dokularında TOS değerleri incelendiğinde 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Arasında anlamlı fark bulunan gruplara bakıldığında, hiperoksik akciğer hasarı (BPD modeli) oluşturulan grubun Profilaktik Tedavi, Plasebo Tedavi ve Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek TOS değerlerine sahip olduğu, ayrıca Profilaktik Plasebo grubunun da Profilaktik Tedavi ve Plasebo Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek TOS değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 3). Akciğer dokusu TAS değerleri bakımından 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiş, onun için ikili kıyaslamalar yapılmamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Akciğer dokularında TOS ve TAS değerleri

Gruplar		TOS AC	TAS AC
Grup I – Sağlıklı (n: 8)	A.O ±S.S	17,71 ± 3,39	0,06 ± 0,04
	Med (IQR)	17,58 (14,43 - 20,22)	0,06 (0,03 - 0,09)
	min - maks	13,19 - 23,35	-0,01 - 0,12
Grup II – BPD (n: 8)	A.O ±S.S	23,06 ± 4,31	0,07 ± 0,05
	Med (IQR)	22,56 (19,44 - 26,77)	0,06 (0,03 - 0,12)
	min - maks	17,82 - 30,4	-0,01 - 0,14
Grup III – Profilaktik Plasebo (n: 7)	A.O ±S.S	18,93 ± 4,78	0,06 ± 0,09
	Med (IQR)	18,61 (14,85 - 23,48)	0,06 (0,02 - 0,13)
	min - maks	12,12 - 26,15	-0,08 - 0,18
Grup IV - Profilaktik Tedavi (n: 7)	A.O ±S.S	12,2 ± 3,66	0,04 ± 0,05
	Med (IQR)	11,67 (9,58 - 16,17)	0,05 (0,01 - 0,07)
	min - maks	6,45 - 16,17	-0,05 - 0,09
Grup V – Plasebo Tedavi (n: 6)	A.O ±S.S	12,52 ± 2,32	0,01 ± 0,02
	Med (IQR)	11,95 (10,67 - 14,98)	0,02 (-0,01 - 0,03)
	min - maks	9,65 - 15,86	-0,01 - 0,03
Grup VI – Tedavi (n: 6)	A.O ±S.S	13,06 ± 2,2	0,02 ± 0,03
	Med (IQR)	13,59 (11,27 - 14,72)	0,01 (-0,01 - 0,05)
	min - maks	9,29 - 15,53	-0,01 - 0,06
Gruplar arası p		0,0001 (F=10,418) *(2-4, 2-5, 2-6, 3-4, 3-5)	>0,05 0,254 (F=1,383)

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler); min – maks: en küçük – en büyük değerler; F: Tek yönlü varyans analizi

Kanda bakılan TOS ve TAS değerleri bakımından 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Kan örneklerinde TOS ve TAS değerleri

Gruplar		TOS KAN	TAS KAN
Grup I – Sağlıklı (n: 8)	A.O ±S.S	15,06 ± 1,81	1,52 ± 0,53
	Med (IQR)	14,81 (13,53 - 17,08)	1,68 (1,18 - 1,81)
	min - maks	12,52 - 17,2	0,46 - 2,12
Grup II – BPD (n: 8)	A.O ±S.S	16,58 ± 5,63	1,47 ± 0,15
	Med (IQR)	18,14 (9,85 - 21,14)	1,5 (1,28 - 1,6)
	min - maks	7,68 - 21,99	1,23 - 1,61
Grup III – Profilaktik Plasebo (n: 7)	A.O ±S.S	15,08 ± 0,57	1,31 ± 0,4
	Med (IQR)	15,23 (14,5 - 15,58)	1,28 (1,02 - 1,62)
	min - maks	14,41 - 15,79	0,85 - 1,95
Grup IV - Profilaktik Tedavi (n: 7)	A.O ±S.S	17,66 ± 3,28	1,63 ± 0,67
	Med (IQR)	18,67 (14,32 - 20,23)	1,52 (1,12 - 2,29)
	min - maks	12,61 - 21,25	0,71 - 2,57
Grup V – Plasebo Tedavi (n: 6)	A.O ±S.S	15,46 ± 0,64	1,85 ± 0,4
	Med (IQR)	15,59 (14,88 - 16,02)	1,95 (1,43 - 2,09)
	min - maks	14,45 - 16,13	1,29 - 2,42
Grup VI – Tedavi (n: 6)	A.O ±S.S	18,31 ± 4,32	2 ± 0,27
	Med (IQR)	17,22 (14,94 - 21,07)	2,03 (1,75 - 2,21)
	min - maks	14,72 - 26,44	1,62 - 2,38
Gruplar arası p		>0,05	>0,05
		0,403 (F=1,055)	0,107 (F=1,993)

A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler); min – maks: en küçük – en büyük değerler; F: Tek yönlü varyans analizi

Ayrıca TOS değerinin TAS değerine oranı olarak değerlendirilen OSİ değerleri incelendiğinde gruplar arasındaki istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır (Tablo5).

Tablo 5. Kan ve akciğer örneklerinde OSI değerleri

Gruplar		OSI_AC	OSI_KAN
Grup I – Sağlıklı (n: 8)	A.O ± S.S	122,38 ± 903,23	12,11 ± 7,57
	Med		9,14 (8,13 -
	(IQR)	348,66 (175,83 - 455,23)	15,05)
Grup II – BPD (n: 8)	A.O ± S.S	64,93 ± 729,47	11,47 ± 4,13
	Med		13,59 (6,16 -
	(IQR)	243,05 (132,25 - 433,93)	13,95)
Grup III – ProfilaktikPlasebo (n: 7)	A.O ± S.S	322,06 ± 477,91	12,39 ± 3,75
	Med		12,36 (9,34 -
	(IQR)	216,86 (108,23 - 463,7)	15,45)
Grup IV - Profilaktik Tedavi (n: 7)	A.O ± S.S	475,13 ± 864,25	12,68 ± 5,48
	Med		12,3 (8,51 -
	(IQR)	215,62 (94,67 - 414,85)	17,15)
Grup V – PlaseboTedavi (n: 6)	A.O ± S.S	55,56 ± 936,09	8,76 ± 2,12
	Med		8,04 (7,47 -
	(IQR)	439,2 (-888,13 - 746,83)	11,08)
Grup VI – Tedavi (n: 6)	A.O ± S.S	-2437,61 ± 4961,84	9,13 ± 1,48
	Med		9,35 (7,8 - 10,29)
	(IQR)	-329,2 (-4952,23 - 377,37)	
Gruplar arası p		>0,05	>0,05

A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler);

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Akciğer dokularındaki alveolar yüzey alanı, fibrozis ve düz kas aktin skoru incelemeleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Alveolar yüzey alanı durumları incelendiğinde 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Sağlıklı, kontrol grubuna göre Grup IV hariç tüm gruplarda belirgin etkilenmenin olduğu, Profilaktik Tedavi (Grup IV) grubunun alveolar yüzey alanı etkilenmesini Grup II, III, V ve VI'ya göre belirgin azalttığı görülmektedir ($p<0,05$, Tablo 6 ve 7).

Fibrozis durumları incelendiğinde 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Düz kas aktin skoru durumları incelendiğinde 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Sağlıklı, kontrol grubuna göre Grup IV hariç tüm gruplarda belirgin etkilenmenin olduğu, Profilaktik Tedavi (Grup IV) grubunun düz kas aktin skorlarının Grup II, III, V ve VI'ya göre belirgin azaldığı görülmektedir ($p<0,05$, Tablo 6 ve 7).

Tablo 6. Akciğer dokularında alveolar yüzey alanı, fibrozis ve düz kas aktin skoru

		Gruplar						Gruplar Arası P
		Grup I – Sağlıklı (n: 8)	Grup II BPD (n: 8)	Grup III Profilaktik Plasebo (n: 7)	Grup IV – Profilaktik Tedavi (n: 7)	Grup V Plasebo Tedavi (n: 6)	Grup VI Tedavi (n: 6)	
Alveolar Yüzey Alanı	Azalma yok	2 (%25)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%14,3)	0 (%0)	0 (%0)	0,0001* (kk=40,596)
	Hafif Azalma	3 (%37,5)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%57,1)	0 (%0)	0 (%0)	
	Orta Azalma	3 (%37,5)	6 (%75)	3 (%42,9)	2 (%28,6)	1 (%16,7)	5 (%83,3)	
	Belirgin Azalma	0 (%0)	2 (%25)	4 (%57,1)	0 (%0)	5 (%83,3)	1 (%16,7)	
Fibrozis	Fibrozis yok	4 (%50)	3 (%37,5)	1 (%14,3)	4 (%57,1)	1 (%16,7)	4 (%66,7)	0,246 (kk=6,669)
	Hafif Fibrozis	4 (%50)	5 (%62,5)	6 (%85,7)	3 (%42,9)	5 (%83,3)	2 (%33,3)	
Düz kas Aktin Skoru	,00	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%14,3)	0 (%0)	0 (%0)	0,0001* (kk=54,702)
	1,00	7 (%87,5)	0 (%0)	0 (%0)	6 (%85,7)	0 (%0)	0 (%0)	
	2,00	1 (%12,5)	6 (%75)	5 (%71,4)	0 (%0)	3 (%50)	6 (%100)	
	3,00	0 (%0)	2 (%25)	2 (%28,6)	0 (%0)	3 (%50)	0 (%0)	

* $p<0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık; frekans ve yüzde (%) değerleri gösterilmiştir. kk: Ki-kare testi

Alveolar yüzey alanı skorları bakımından gruplar arasında ikili incelemeler yapıldığında; hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan (Grup II) ratlarda alveolar yüzey alanının kontrol grubuna (Grup I) göre belirgin olarak etkilendiği ($p<0,01$), buna karşın profilaktik olarak uygulanan anne sütü eksozomunun (Grup IV) alveolar yüzey alanı etkilenmesini Grup III (Profilaktik Plasebo), Grup V (Plasebo Tedavi) ve Grup VI (Tedavi)'ya göre belirgin şekilde azalttığı ($p<0,05$), ayrıca sağlıklı kontrol grubuyla aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı saptandı. Anne sütü eksozomunun tedavi (Grup VI) edici özelliği değerlendirildiğinde; alveolar yüzey

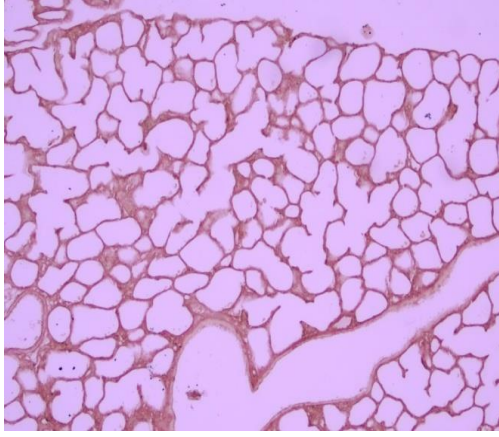
alanı bakımından etkinliğinin sadece plaseboya kıyasla etkin olduğu ($p<0.05$), profilaktik tedavi karşısında etkisiz ($p<0.05$) ve BPD grubuyla istatistiksel bir farklılığın olmadığı görülmüştür (Tablo 6). Bu sonuçlarla, hiperoksik akciğer hasarlanmasının (BPD modeli) alveolar yüzey alanını belirgin olarak etkilediği, profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının ise belirgin olarak bu etkilenmeyi azalttığı saptanmıştır.

Düz kas aktin skorları bakımından gruplar arasında ikili incelemeler yapıldığında; Grup II (BPD)'nin sağlıklı gruba (Grup I) göre belirgin etkilendiği ($p<0.01$), yine kontrol grubuna göre Grup IV dışında diğer tüm gruplarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu ($p<0.01$), buna karşın profilaktik anne sütü uygulanan grubun (Grup IV) ise Grup II (BPD), Grup III (Profilaktik Plasebo), Grup V (Plasebo Tedavi) ve Grup VI (Tedavi)'ya göre düz kas aktin skorlarını belirgin düzelttiği ($p<0.01$), ancak kontrol grubuyla (Grup I) aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı saptandı (Tablo 6). Bu durum hiperoksi uygulanan gruplarda akciğer düz kas aktin içeriğinin belirgin olarak arttığını, ancak profilaktik anne sütü eksozom uygulamasının akciğer düz kas aktin skorlarını belirgin olarak düzelttiğini ortaya koymaktadır.

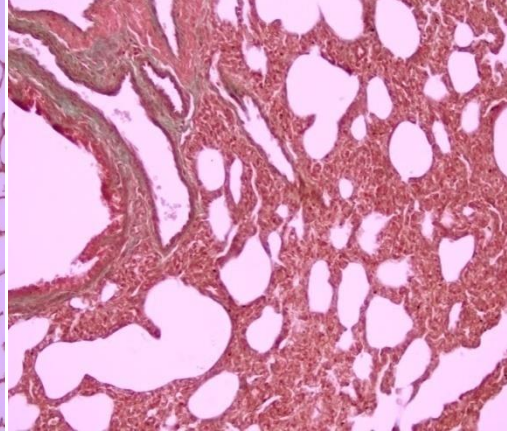
Tablo 7. Akciğer dokularında alveolar yüzey alanı ve düz kas aktin skoru değerleri, ikili karşılaştırmalar

Gruplar		Alveolar yüzey alanı	Düz kas aktin skoru
Grup I – Sağlıklı (n: 8)	A.O ± S.S	1,13 ± 0,83	1,13 ± 0,35
	Med (IQR)	1 (0,25 - 2)	1 (1 - 1)
	min - maks	0 - 2	1 - 2
Grup II – BPD (n: 8)	A.O ± S.S	2,25 ± 0,46	2,25 ± 0,46
	Med (IQR)	2 (2 - 2,75)	2 (2 - 2,75)
	min - maks	2 - 3	2 - 3
Grup III – Profilaktik Plasebo(n: 7)	A.O ± S.S	2,57 ± 0,53	2,29 ± 0,49
	Med (IQR)	3 (2 - 3)	2 (2 - 3)
	min - maks	2 - 3	2 - 3
Grup IV - Profilaktik Tedavi(n: 7)	A.O ± S.S	1,14 ± 0,69	0,86 ± 0,38
	Med (IQR)	1 (1 - 2)	1 (1 - 1)
	min - maks	0 - 2	0 - 1
Grup V – Plasebo Tedavi (n: 6)	A.O ± S.S	2,83 ± 0,41	2,5 ± 0,55
	Med (IQR)	3 (2,75 - 3)	2,5 (2 - 3)
	min - maks	2 - 3	2 - 3
Grup VI – Tedavi (n: 6)	A.O ± S.S	2,17 ± 0,41	2 ± 0
	Med (IQR)	2 (2 - 2,25)	2 (2 - 2)
	min - maks	2 - 3	2 - 2
Gruplar arası p		0,0001 (kw=25,235)	0,0001 (kw=31,814)
İkili karşılaştırmalar		*1-2,1-3,1-5,1-6, 2-4, 2-5,3-4, 4-5, 4-6, 5-6	*1-2, 1-3, 1-5, 1-6, 2-4, 3-4, 4-5, 4-6

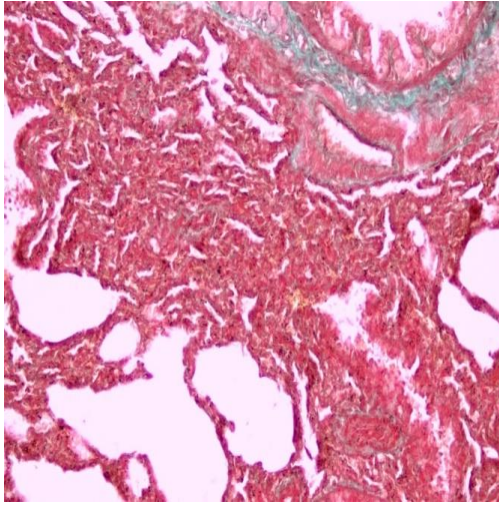
* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdelikler); min – maks: en küçük – en büyük değerler; kw: Kruskal Wallis Varyans Analizi



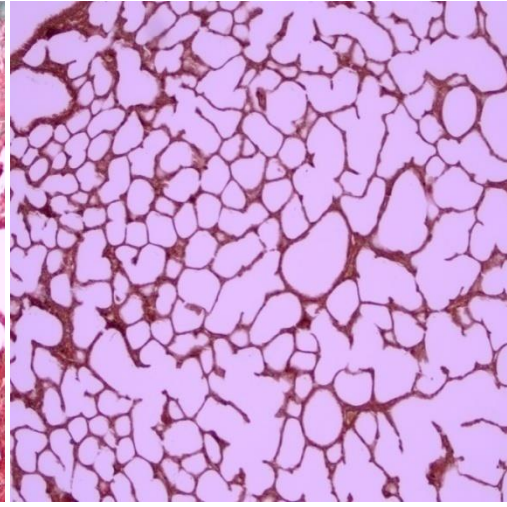
Şekil 6A (Grup 1)



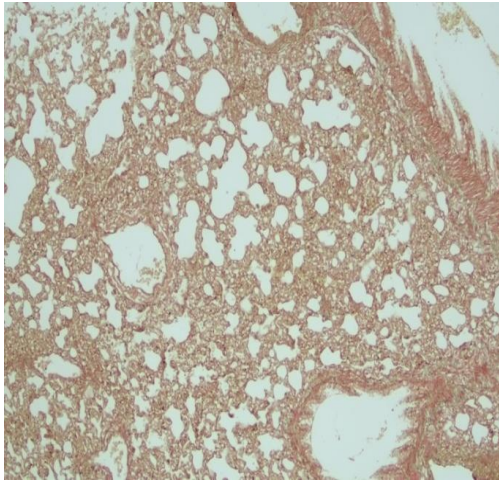
Şekil 6B (Grup 2)



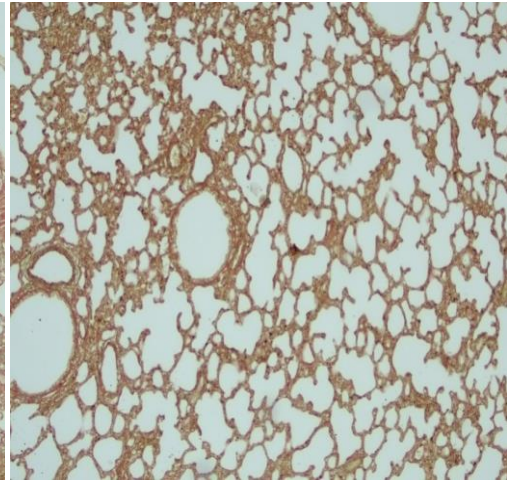
Şekil 6C (Grup 3)



Şekil 6D (Grup 4)

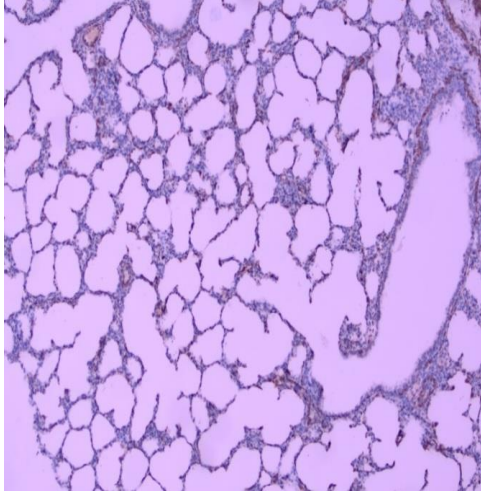


Şekil 6E (Grup 5)

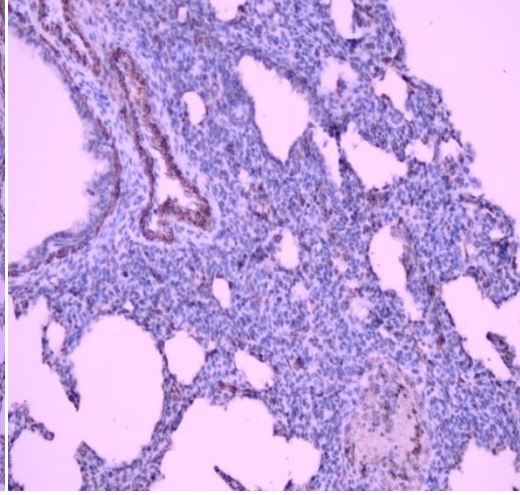


Şekil 6F (Grup 6)

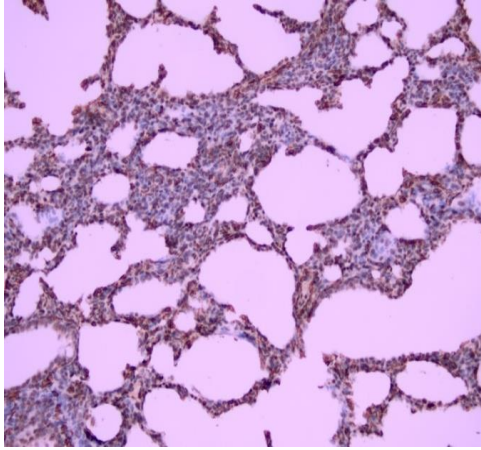
Şekil 6. Akciğer dokularında fibrozisin değerlendirilmesi (x10, Mason-Trikrom boyama).



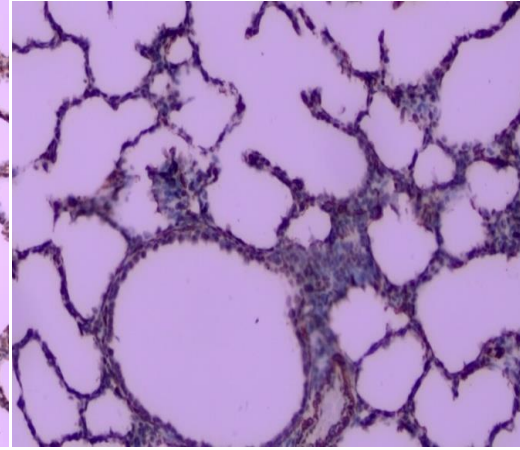
Şekil 7A (Grup 1)



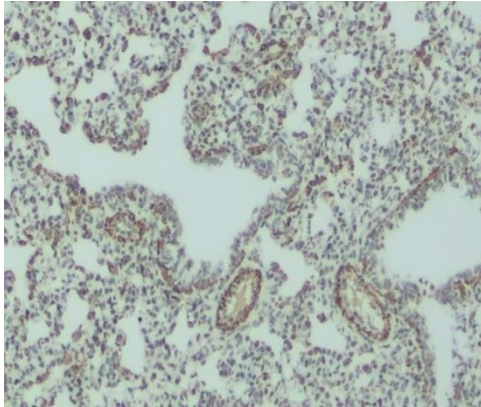
Şekil 7B (Grup 2)



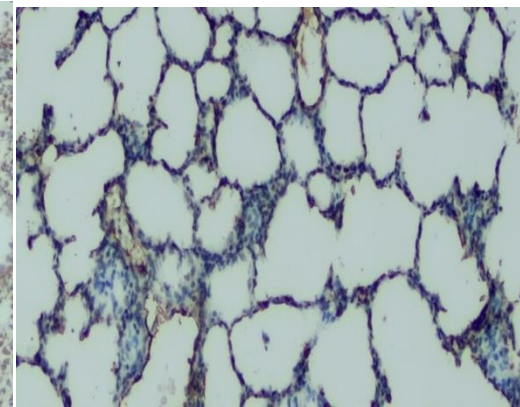
Şekil 7C (Grup 3)



Şekil 7D (Grup 4)

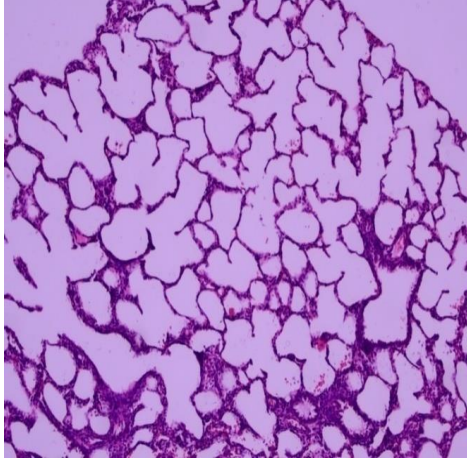


Şekil 7E (Grup 5)

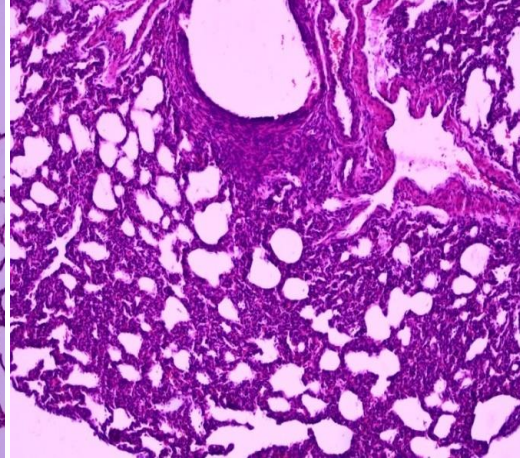


Şekil 7F (Grup 6)

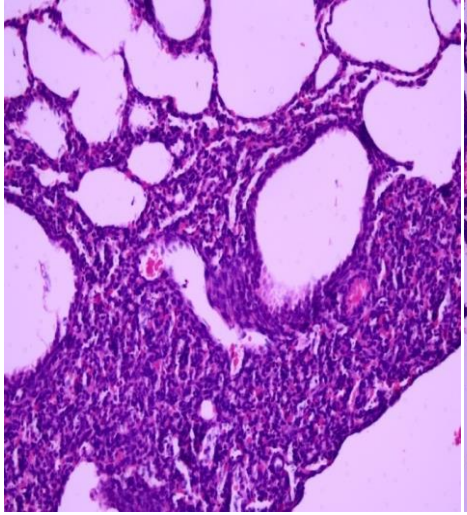
Şekil 7. Akciğer dokularında düz kas aktin (SMA) boyama değerlendirilmesi(x10, SMA boyama).



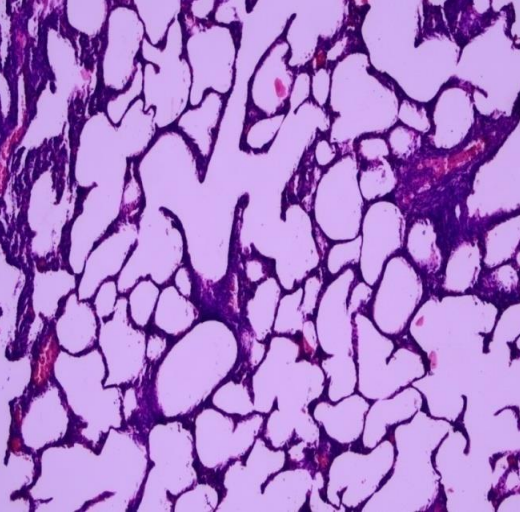
Şekil 8A (Grup 1)



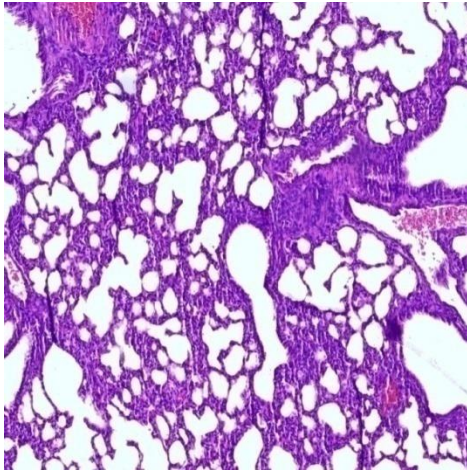
Şekil 8B (Grup 2)



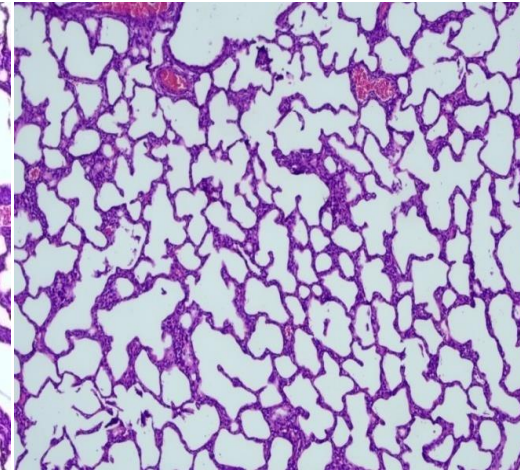
Şekil 8C (Grup 3)



Şekil 8D (Grup 4)

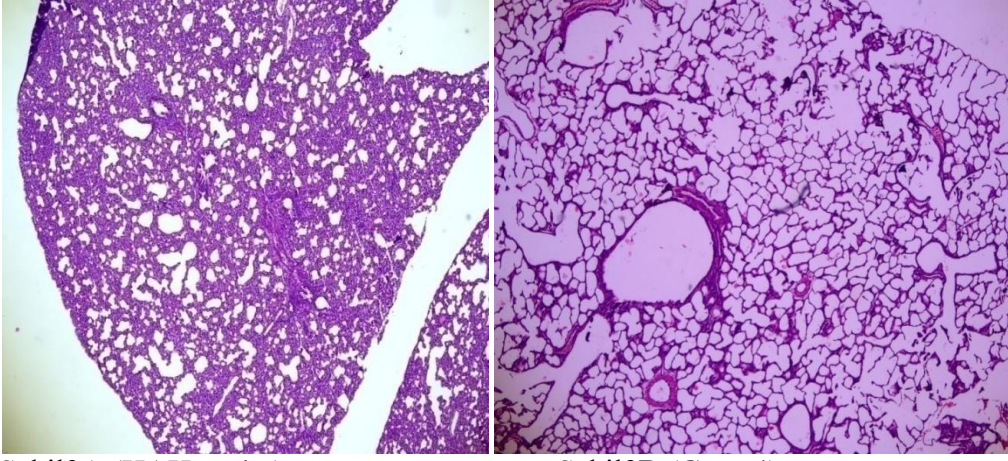


Şekil 8E (Grup 5)



Şekil 8F (Grup 6)

Şekil 8. Akciğer dokusu alveol yüzey alanı değerlendirmesi (x10, H&E boyama)



Şekil9A (HAH grubu)

Şekil9B (Grup 4)

Şekil 9. X4 büyütmede H&E boyamada grup 2 ve 4

Profilaktik anne sütü eksozomunun (Grup 4) hiperoksik akciğer hasarına (HAH) göre akciğer alveol yüzey alanı skorunu belirgin düzeltmesi görülmekte.

TARTIŞMA

BPD, prematüre bebeklerde sık görülen bir komplikasyondur. Son yıllarda yenidoğan yoğunbakım ünitelerinde ventilasyon imkan ve yöntemlerinin gelişmesi, gebelikte steroid uygulaması, doğum sonrası sürfaktan uygulaması gibi gelişmelerle 25-28 hafta gibi daha küçük haftada doğan bebeklerin yaşam şansı artmıştır. Bu bebeklerde daha hafif bulgularla seyreden “yeni BPD” görülmektedir.

BPD gelişiminde etiyoloji tam olarak net olmasa da başta prematürite/immatürite, mekanik ventilasyon ve oksijen toksitesi olmak üzere prenatal enfeksiyon, gebelikte sigara içilmesi, annede hipertansiyon ve intrauterin büyüme kısıtlılığı, şiddetli RDS, PDA, akciğer ödemi, erkek cinsiyet ve genetik gibibazı risk faktörleri tanımlanmaktadır (18). Bu faktörlerin sebep olduğu akut akciğer hasarı nedeniyle akciğerde yapısal ve fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (19).

Prematüre bebeklerin oksidatif strese daha duyarlı olmaları nedeniyle oksidatif stres BPD oluşumunda önemli bir mekanizmadır. Patogenezde serbest radikal oluşumu ve antioksidan sistem dengelerinin bozulması etkilidir. Oksijen toksitesi, BPD gelişimindeki en önemli nedenlerden biridir. Bizim çalışmamızda da yenidoğan ratlarda BPD modeli oluşturmak amacıyla daha önceki çalışmalarda da kullanıldığı gibi (104) hiperoksi modeli kullanılmıştır.

Akciğer gelişimi sırasında sakküler ve alveoler evrelerde akciğer yüzey alanı ve alveol sayısında artış, kan damar sayısı ve maturasyon artışı gerçekleşir ve interstisyel aralıkların daralmasıyla alveol ve kapiller arasında ince bir bariyer oluşarak etkili gaz alışverişi sağlanır (16). Eski BPD, hava yolu düz kaslarında hiperplazi, skuamöz metaplazi, alveollerde fibrozis, fibroproliferasyon, pulmoner arter hipertansiyonuna bağlı bulgular ve alveol yüzey alanında azalma ile karakterizedir. Yeni BPD’de ise alveollerde hipoplazi, asiner kompleks ve vasküler yatak azalması, dismorfizm, değişen miktarlarda hava yollarının düz kaslarında hiperplazi ve intersitisyel fibroproliferasyon ile eski BPD’yle karşılaştırıldığında daha hafif arteriyel ve arteriolar lezyonlar mevcuttur (17). Çalışmamızda alveolar yüzey alanı skorları bakımından gruplar değerlendirildiğinde; hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan ratlarda alveolar yüzey alanının kontrol grubuna göre belirgin olarak

etkilendiği, buna karşın profilaktik olarak uygulanan anne sütü eksozomunun alveolar yüzey alanı etkilenmesini hem hiperoksik akciğer hasarlanması grubu hem de diğer tüm gruplara göre belirin şekilde azalttığı, ayrıca sağlıklı kontrol grubuyla aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı saptandı. Anne sütü eksozomunun tedavi edici özelliği değerlendirildiğinde ise alveolar yüzey alanı skorunu sadece plaseboya kıyasla azalttığı, ancak profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasına karşın etkisiz olduğu ve BPD grubuyla da istatistiksel bir farklılığın olmadığı görüldü. Böylece hiperoksik akciğer hasarlanmasının alveolar yüzey alanını belirgin etkilediği, profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının ise belirgin olarak bu etkilenmeyi azalttığı saptanmıştır. Daha önce yapılan ve hiperoksik akciğer hasarında Bosentan etkilerini araştıran bir çalışmada da hiperoksiye maruz bırakılan ratlarda alveol yüzey alanında belirgin azalma saptandığı gösterilmiştir (13). Elde ettiğimiz bulgular hiperoksik akciğer hasarında erken anne sütü eksozom uygulamasının geç uygulamaya, ya da tedavi grubuna göre alveol yüzey alanı açısından çok daha olumlu sonuçlar sağladığını göstermektedir.

Oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen hüresel hasar ve hücre ölümü fibrozise neden olarak BPD gelişimine sebebiyet vermektedir (111). Fibrozis sürecinde aktif miyofibroblastlarda büyüme ve skar dokusu oluşumu meydana gelmektedir. Çalışmamızda akciğer dokularında fibrozis durumları incelendiğinde 6 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Bu durumun fibrozis oluşması için yeterli süre geçmemiş olabileceği ve vaka sayısının azlığına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Daha önce yapılan ve bizim çalışmamızdan daha uzun süre hiperoksi uygulanan bir çalışmada hiperoksi uygulanan ratlarda fibrozis gelişimi gösterilmiştir (13).

Daha nceki benzer çalışmalarda hiperoksi maruziyetiyle BPD modeli oluşturulan yenidoğan ratların akciğer dokularında düz kas aktin skorunun arttığı, Bosentan (13) ve Resveratrol (112) uygulamalarının düz kas aktin skorunu azaltıcı yönde etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda düz kas aktin skorları bakımından gruplar değerlendirildiğinde; hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan ratlarda sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin etkilenme olduğu, yine kontrol grubuna göre Grup IV (Profilaktik Tedavi) dışında diğer tüm gruplarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu, buna karşın profilaktik anne sütü uygulamasının

ise Grup II (BPD), Grup III (Profilaktik Plasebo), Grup V (Plasebo Tedavi) ve Grup VI (Tedavi)'ya göre düz kas aktin skorlarını belirgin düzelttiği, ancak kontrol grubuyla aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Bu durum hiperoksi uygulanan gruplarda akciğer düz kas aktin içeriğinin belirgin olarak arttığını, ancak profilaktik anne sütü eksozom uygulamasının akciğer düz kas aktin skorlarını belirgin olarak düzelttiğini ortaya koymaktadır.

Akciğer için oksijenin toksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Neonatal ratlarda %50 ve üstünde oksijene maruziyetin akciğer hasarına neden olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (113). Yüksek oksijenin akciğerler üzerindeki toksik etkileri serbest oksijen radikallerinin çeşitli molekülleri (DNA, protein, lipit vb) etkileyerek hasar oluşturması nedeniyle meydana gelmektedir. Böylece hiperoksi, distal hava yollarında gelişmede duraklamaya sebep olacak etkiler oluşturmaktadır (111). Hiperoksi maruziyeti nedeniyle reaktif oksijen ürünlerinin artışı ve oksidan stres meydana gelmektedir (7). Bu etkiler özellikle prematüre bebeklerde belirgindir. Bunun nedeni prematüre bebeklerde intraselüler antioksidan mekanizmaların term bebeklere göre yetersiz olması ve oksidatif stresten sonra term bebeklerde antioksidan mekanizmaların enzimleri yeterince indükleyebilmesine rağmen prematüre bebeklerde bu indüklenmenin yeteri kadar olamamasıdır.

Oksidatif stres birçok neonatal dönem hastalığında çok önemli rol oynamaktadır. Çalışmalarda prematüre yenidoğanlarda oksidatif stres ile intrauterin büyüme geriliği, nekrotizan enterokolit, BPD, intraventriküler kanama, fetal inflamatuvar yanıt sendromu, erken neonatal sepsis, prematüre retinopatisi arasında pozitif asosiyasyon olduğu gösterilmiştir (114). Başka bir çalışmada oksidatif stresin, pulmoner damarların yoğunluğunda azalma ve pulmoner arteriyoler duvarların kalınlaşması ile sonuçlanan vasküler tonusun ve pulmoner vazodilatörlere verilen yanıtın modülasyonu yoluyla yenidoğanlarda pulmoner hipertansiyon patogenezinde de rol oynadığı gösterilmiştir (115). Çalışmamızda BPD modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda oksidatif stres belirteci olarak TOS ve TAS düzeyleri ile erken ve geç subkutan anne sütü eksozomu uygulamasının bunlar üzerindeki etkileri incelenmiş, ayrıca TOS/TAS oranı olarak adlandırılan oksidatif stres indeksi (OSİ) de değerlendirilmiştir.

Erel tarafından geliştirilmiş bir ölçüm yöntemi olan TAS, serumdaki antioksidanların durumunu gösterir. Bizim çalışmamıza benzer bir çalışma olan

neonatal ratlarda hiperoksiyle indüklenmiş pulmoner hasar sonrası dekspantenol uygulaması yapılan Özdemir ve ark.'nın çalışmasında, TAS düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmaz iken, TOS düzeyi hiperoksi uygulanan gruplarda yüksek, dekspantenol uygulanan gruplarda ise düşük saptanmıştır (116). Çalışmamıza benzer başka bir çalışma olan Taban'ın çalışmasında yenidoğan ratlarda hiperoksik akciğer hasarı sonrası bosentan uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada TAS düzeyi hiperoksi grubunda anlamlı derecede düşük saptanmıştır. TOS düzeyinde anlamlı farklılık geç bosentan tedavisi verilen gruba göre oda havasında bosentan verilen grupta saptanmış, diğer gruplar arasında ise anlamlı farklılık saptanmamıştır (13). Zhou ve ark.'nın hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda anne sütü eksozomu uygulaması yapılan çalışmasında anne sütü eksozomunun tip II alveoler epitel hücrelerinin proliferasyonunu indükleyerek ve IL-17 sinyal yolu üzerinden apoptozlarını inhibe ederek BPD üzerinde koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (104). Hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan çalışmamızda, hiperoksik hasar grubunda (Grup II) TOS değerlerini Profilaktik Tedavi, Plasebo Tedavi ve Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek, ayrıca Profilaktik Plasebo grubunun da Profilaktik Tedavi ve Plasebo Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek TOS değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak, akciğer dokusu TAS ve kandan bakılan TOS ve TAS değerlerindeve ayrıca hem akciğer doku hem de kan OSİ değerlerindeistatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Bu sonuçlar hiperoksik akciğer hasarlanmasında TOS değerlerinin belirgin arttığını, buna karşın profilaktik grupta daha belirgin olsa daanne sütü eksozomu uygulanmasının TOS değerlerini belirgin azalttığını göstermiştir.

Literatürde şu ana kadar hiperoksik akciğer hasarı modeli ve subkutan anne sütü eksozomuyla ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu yönüyle literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

SONUÇLAR

Hiperoksik akciğer hasarı uygulamasıyla BPD modeli oluşturulan bu deneysel çalışmada;

- A) Alveol yüzey alanları incelendiğinde hiperoksiyle BPD modeli oluşan ratlarda kontrol grubuna göre belirgin etkilenme olduğu,
- B) Profilaktik olarak uygulanan anne sütü eksozomunun alveolar yüzey alanı etkilenmesini Grup III (Profilaktik Plasebo), Grup V (Plasebo Tedavi) ve Grup VI (Tedavi)'ya göre belirgin şekilde azalttığı, ancak kontrol grubuyla aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı,
- C) Anne sütü eksozomu tedavisinin sadece plaseboya kıyasla etkili olduğu, hiperoksik grupla aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı, profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının ise tedaviye üstün olduğu,
- D) Düz kas aktin skorları değerlendirildiğinde; hiperoksik grubun (BPD) sağlıklı gruba göre belirgin etkilendiği,
- E) Kontrol grubuna göre Grup IV dışında düz kas aktin skorlarının diğer tüm gruplarda belirgin yüksek olduğu,
- F) Profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının Grup II (BPD), Grup III (Profilaktik Plasebo), Grup V (Plasebo Tedavi) ve Grup VI (Tedavi)'e göre düz kas aktin skorlarını belirgin düzelttiği, ancak kontrol grubuyla aralarında istatistiksel bir farklılığın olmadığı,
- G) Akciğer fibrozisi değerlendirmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı,
- H) Hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan grupta (Grup II) TOS değerlerinin Profilaktik Tedavi, Plasebo Tedavi ve Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu,
- İ) Profilaktik Plasebo grubunun da Profilaktik Tedavi ve Plasebo Tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek TOS değerlerine sahip olduğu,
- J) Akciğer dokusu TAS ve kandan bakılan TOS ve TAS değerlerinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı,
- K) Gruplar arasında OSİ bakımından da istatistiksel bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Hiperoksik akciğer hasarlanması yöntemiyle ratlarda oluşturulan BPD modelinin akciğer alveolar skor değerinin kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanması, düz kas aktin değerlendirmesinde kontrol grubuna göre belirgin etkilenmenin gösterilmesiyle hiperoksik akciğer hasarlanmasının histopatolojik olarak oluştuğunu göstermektedir. Akciğer fibrozisi bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmasa da BPD ve plasebo gruplarında hasar riskinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Akciğer ve kan TOS değerlerinin yine BPD grubunda yüksek olduğu ancak kontrol grubuyla aralarında istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır. Akciğer ve kan TAS değerleri bakımından da anlamlı bir farklılık gösterilememiştir. Anne sütü eksozomu uygulaması bakımından değerlendirildiğinde ise özellikle profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının hem akciğer alveolar yüzey alanı skorunu iyileştirmesi hem de düz kas aktin skorunu belirgin düşürmesi ve ayrıca akciğer doku TOS değerlerini de belirgin düşürmesi nedeniyle hiperoksik akciğer hasarında belirgin histopatolojik ve biyokimyasal düzelmeye yaptığı, yani belirgin koruyucu rolünün olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca yine profilaktik anne sütü eksozomu uygulaması total oksidan etkilenmeyi de plasebo grubuna göre de belirgin azaltmaktadır.

Sonuç olarak, hiperoksik akciğer hasarı ile BPD modeli oluşturulan bu deneysel çalışmada profilaktik anne sütü eksozomu uygulamasının hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak akciğer hasarını önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir. BPD yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin önemli bir sağlık sorunu olarak görülmeye devam etmekte ve şu an için de kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Son yıllarda özellikle erken tanı ve önleyici stratejiler üzerinde durulmaktadır, bu yönüyle önleyici bir tedavi yöntemi olarak anne sütü eksozumunun BPD gelişme ihtimali yüksek olan bebeklere profilaktik olarak uygulanması bakımından bu çalışmamızın önemli olduğunu, ancak bu alanda daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Arsan S, Toygar A, Oğuz S. Türk Neonatoloji Derneği Bronkopulmoner Displazi Korunma ve İzlem Rehberi 2018.
2. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 2014 Mar;32(3):252-60.
3. Pisano C, Galley J, Elbahrawy M, Wang Y, Farrell A, Brigstock D, et al. Human Breast Milk-Derived Extracellular Vesicles in the Protection Against Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2020 Jan; 55(1): 54-58.
4. Ambalavanan N, Carlo WA. Bronchopulmonary dysplasia: new insights. *Clin Perinatol* 2004 Sep; 31(3): 613-28.
5. Eber E, Zach MS. Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). *Thorax* 2001 Apr; 56(4): 317-23.
6. Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967 Feb 16; 276(7): 357-68.
7. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Jun; 163(7): 1723-9.
8. Pusey VA, Macpherson RI, Chernick V. Pulmonary fibroplasia following prolonged artificial ventilation of newborn infants. *Can Med Assoc J* 1969 Mar 8; 100(10): 451-7.
9. Bancalari E, Claire N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol* 2003 Feb; 8(1): 63-71.
10. Bancalari EH, Jobe AH. The respiratory course of extremely preterm infants: a dilemma for diagnosis and terminology. *J Pediatr* 2012 Oct;161(4):585-8.
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 Dec; 179(6 Pt 1): 1632-9.
12. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2001 Jan; 107(1): E1.

13. Taban Ö, Hiperoksik Akciğer Hasarı Oluşturulan Yenidoğan Ratlarda Bosentanın Akciğerdeki Histopatolojik ve Biyokimyasal Etkileri, (Tıpta Uzmanlık), Denizli: Pamukkale Üniversitesi. 2018.
14. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* 2007 Nov 8; 357(19): 1946-55.
15. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003 Feb;8(1):73-81.
16. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 2006;89(4):313-22.
17. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 1998 Jul;29(7):710-7.
18. Chang LY, Subramaniam M, Yoder BA, Day BJ, Ellison MC, Sunday ME, et al. A catalytic antioxidant attenuates alveolar structural remodeling in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 1;167(1):57-64.
19. Taghizadeh A, Reynolds EO. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia following hyaline membrane disease. *Am J Pathol* 1976 Feb;82(2):241-64.
20. Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, et al. Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics* 2009 Sep;124(3):e439-49.
21. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006 Aug;30(4):171-8.
22. Askie LM, Henderson-Smart DJ, Irwig L, Simpson JM. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 2003 Sep 4;349(10):959-67.
23. Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics* 2000 Feb;105(2):295-310.
24. Laughon MM, Smith PB, Bose C. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009 Dec;14(6):374-82.
25. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol* 2003 Feb; 8(1): 19-27.
26. Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, O'Shea TM, Allred EN, Karna P, et al. Extremely Low Gestational Age Newborn Study Investigators. Fetal growth

restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* 2009 Sep; 124(3): e450-8.

27. 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 Jan 1; 302(1): L36-46.
28. Isayama T, Shah PS, Ye XY, Dunn M, Da Silva O, Alvaro R, Lee SK. Adverse Impact of Maternal Cigarette Smoking on Preterm Infants: A Population-Based Cohort Study. *Am J Perinatol* 2015 Oct; 32(12): 1105-11.
29. Minoo P. Transcriptional regulation of lung development: emergence of specificity. *Respir Res* 2000; 1(2): 109-15. doi: 10.1186/rr20. Epub 2000 Sep 1.
30. Stroustrup A, Trasande L. Epidemiological characteristics and resource use in neonates with bronchopulmonary dysplasia: 1993-2006. *Pediatrics* 2010 Aug;126(2):291-7.
31. Kalikkot Thekkeveedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. *Respir Med* 2017 Nov;132:170-177.
32. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Lerner-Geva L, Reichman B; Israel Neonatal Network. Outcome of early-onset sepsis in a national cohort of very low birth weight infants. *Pediatrics* 2010 Apr; 125(4): e736-40.
33. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996 Jun; 39(6): 966-75.
34. Merrill JD, Ballard RA, Cnaan A, Hibbs AM, Godinez RI, Godinez MH, Truog WE, Ballard PL. Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants. *Pediatr Res* 2004 Dec; 56(6): 918-26.
35. 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 Feb; 105(2): 320-4.
36. 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 Jul 15; 182(2): 237-45.
37. Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *J Clin Med* 2017 Jan 6; 6(1): 4.

38. Trittmann JK, Nelin LD, Klebanoff MA. Bronchopulmonary dysplasia and neurodevelopmental outcome in extremely preterm neonates. *Eur J Pediatr* 2013 Sep; 172(9): 1173-80.
39. 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 Nov; 124: 21-29.
40. Wyllie J, Bruinenberg J, Roehr CC, Rüdiger M, Trevisanuto D, Urlesberger B. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 7. Resuscitation and support of transition of babies at birth. *Resuscitation*. 2015 Oct; 95: 249-63.
41. Subramaniam P, Ho JJ, Davis PG. Prophylactic nasal continuous positive airway pressure for preventing morbidity and mortality in very preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2016 Jun 14; (6): CD001243.
42. Ballard RA, Keller RL, Black DM, Ballard PL, Merrill JD, Eichenwald EC et al. and the TOLSURF Study Group. Randomized Trial of Late Surfactant Treatment in Ventilated Preterm Infants Receiving inhaled Nitric Oxide. *J Pediatr* 2016;168:23-29.
43. Park HW, Lim G, Chung SH, Chung S, Kim KS, Kim SN. Early Caffeine Use in Very Low Birth Weight Infants and Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Korean Med Sci* 2015 Dec;30(12):1828-35.
44. Elmowafi M, Mohsen N, Nour I, Nasef N. Prophylactic versus therapeutic caffeine for apnea of prematurity: a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2022 Dec;35(25):6053-6061.
45. Lodha A, Seshia M, McMillan DD, Barrington K, Yang J, Lee SK, et al. Canadian Neonatal Network. Association of early caffeine administration and neonatal outcomes in very preterm neonates. *JAMA Pediatr* 2015 Jan;169(1):33-8.
46. Onland W, Offringa M, De Jaegere AP, van Kaam AH. Finding the optimal postnatal dexamethasone regimen for preterm infants at risk of bronchopulmonary dysplasia: a systematic review of placebo-controlled trials. *Pediatrics* 2009;123(1):367-77.
47. Eichenwald EC, Stark AR. Are postnatal steroids ever justified to treat severe bronchopulmonary dysplasia? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;92(5):F334-7
48. Darlow BA, Graham PJ, Rojas-Reyes MX. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2016 Aug 22; 2016(8): CD000501.
49. Barrington KJ, Finer N, Pennaforte T. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2017 Jan 3; 1(1): CD000509.

50. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med* 2010 Sep; 14(9): 2190-9.
51. Ahn SY, Park WS, Sung SI, Chang YS. Mesenchymal stem cell therapy for intractable neonatal disorders. *Pediatr Neonatol* 2021 Feb; 62 Suppl 1: S16-S21.
52. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012 Jul; 64(3): 676-705.
53. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 2012 Jun; 80(6): 1948-57.
54. Phillips W, Willms E, Hill AF. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations. *Proteomics* 2021 Jul; 21(13-14): e2000118.
55. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983 Aug; 97(2): 329-39.
56. Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J, Del Turco D et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol* 2014 Jun 3; 12(6): e1001874.
57. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996 Mar 1; 183(3): 1161-72.
58. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016 Jan; 14(1): 48-56.
59. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020 Feb 7; 367(6478): eaau6977.
60. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018 Apr; 19(4): 213-228.
61. McAndrews KM, Kalluri R. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Mol Cancer* 2019 Mar 30; 18(1): 52.
62. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019 Jan; 21(1): 9-17.

63. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol* 2018 Apr 30; 9: 738.
64. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018 Jan; 75(2): 193-208.
65. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013 Apr; 91(4): 431-7.
66. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
67. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: *Nat Med* 2016 Dec 6; 22(12): 1502.
68. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002 May 20; 195(10): 1303-16.
69. Torben H.J. Springer. RNA exosome. New York: Science+Business Media, 2010.
70. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007 Oct 1; 110(7): 2440-8.
71. Chaput N, Taïeb J, Scharz N, Flament C, Novault S, André F, et al. The potential of exosomes in immunotherapy of cancer. *Blood Cells Mol Dis* 2005 Sep-Oct; 35(2): 111-5.
72. Pitt JM, André F, Amigorena S, Soria JC, Eggermont A, Kroemer G, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest* 2016 Apr 1; 126(4): 1224-32.
73. Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, et al. Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* 2017 Jul 7;7(10):2732-2745.
74. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014 Mar; 14(3): 195-208.
75. Li X, Chen C, Wei L, Li Q, Niu X, Xu Y, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Cytherapy* 2016 Feb; 18(2): 253-62.

76. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013 Feb; 60(1): 49-74.
77. Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Feb 25; 111(8): 3074-9.
78. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Campo RD, Fernández L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact* 2012 Feb; 28(1): 36-44.
79. Kong C, Elderman M, Cheng L, de Haan BJ, Nauta A, de Vos P. Modulation of Intestinal Epithelial Glycocalyx Development by Human Milk Oligosaccharides and Non-Digestible Carbohydrates. *Mol Nutr Food Res* 2019 Sep; 63(17): e1900303.
80. Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, Martens EC, Desai P, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* 2011 Nov 17; 10(5): 507-14.
81. Comstock SS, Wang M, Hester SN, Li M, Donovan SM. Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *Br J Nutr* 2014 Mar 14; 111(5): 819-28.
82. Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr* 2010 Apr; 156(4): 562-7.e1.
83. Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2007 Apr; (153): 1-186.
84. Okamoto T, Shirai M, Kokubo M, Takahashi S, Kajino M, Takase M, et al. Human milk reduces the risk of retinal detachment in extremely low-birthweight infants. *Pediatr Int.* 2007 Dec; 49(6): 894-7.
85. Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Wright LL, Langer JC, et al. NICHD Neonatal Research Network. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics* 2006 Jul; 118(1): e115-23.
86. Singhal A, Cole TJ, Lucas A. Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet* 2001 Feb 10; 357(9254):413-9.
87. Singhal A, Farooqi IS, O'Rahilly S, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am J Clin Nutr* 2002 Jun; 75(6): 993-9.

88. Brooker BE. The epithelial cells and cell fragments in human milk. *Cell Tissue Res* 1980; 210(2): 321-32.
89. Hu Y, Thaler J, Nieuwland R. Extracellular Vesicles in Human Milk. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021 Oct 15; 14(10): 1050.
90. Reif S, Elbaum Shiff Y, Golan-Gerstl R. Milk-derived exosomes (MDEs) have a different biological effect on normal fetal colon epithelial cells compared to colon tumor cells in a miRNA-dependent manner. *J Transl Med* 2019 Sep 30; 17(1): 325.
91. Miyake H, Lee C, Chusilp S, Bhalla M, Li B, Pitino M, et al. Human breast milk exosomes attenuate intestinal damage. *Pediatr Surg Int* 2020 Feb; 36(2): 155-163.
92. Hock A, Miyake H, Li B, Lee C, Ermini L, Koike Y, et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg* 2017 May; 52(5): 755-759.
93. Wang X, Yan X, Zhang L, Cai J, Zhou Y, Liu H, et al. Identification and Peptidomic Profiling of Exosomes in Preterm Human Milk: Insights Into Necrotizing Enterocolitis Prevention. *Mol Nutr Food Res* 2019 Jul; 63(13): e1801247.
94. Reif S, Elbaum-Shiff Y, Koroukhov N, Shilo I, Musseri M, Golan-Gerstl R. Cow and Human Milk-Derived Exosomes Ameliorate Colitis in DSS Murine Model. *Nutrients* 2020 Aug 26; 12(9): 2589.
95. van Herwijnen MJ, Zonneveld MI, Goerdalay S, Nolte-'t Hoen EN, Garssen J, Stahl B, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Milk-derived Extracellular Vesicles Unveils a Novel Functional Proteome Distinct from Other Milk Components. *Mol Cell Proteomics* 2016 Nov; 15(11): 3412-3423.
96. Komine-Aizawa S, Ito S, Aizawa S, Namiki T, Hayakawa S. Cow milk exosomes activate NK cells and $\gamma\delta$ T cells in human PBMCs in vitro. *Immunol Med* 2020 Dec; 43(4): 161-170.
97. Näslund TI, Paquin-Proulx D, Paredes PT, Vallhov H, Sandberg JK, Gabrielsson S. Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS* 2014 Jan 14; 28(2): 171-80.
98. Donalizio M, Cirrincione S, Rittà M, Lamberti C, Civra A, Francese R, et al. Extracellular Vesicles in Human Preterm Colostrum Inhibit Infection by Human Cytomegalovirus In Vitro. *Microorganisms* 2020 Jul 21; 8(7): 1087.
99. Oliveira MC, Pieters BCH, Guimarães PB, Duffles LF, Heredia JE, Silveira ALM, et al. Bovine Milk Extracellular Vesicles Are Osteoprotective by Increasing Osteocyte Numbers and Targeting RANKL/OPG System in Experimental Models of Bone Loss. *Front Bioeng Biotechnol* 2020 Jul 31; 8: 891.

100. Arntz OJ, Pieters BC, Oliveira MC, Broeren MG, Bennink MB, de Vries M, et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. *Mol Nutr Food Res* 2015 Sep; 59(9): 1701-12.
101. Badawy AA, El-Magd MA, AlSadrah SA. Therapeutic Effect of Camel Milk and Its Exosomes on MCF7 Cells In Vitro and In Vivo. *Integr Cancer Ther* 2018 Dec; 17(4): 1235-1246.
102. Capello M, Vykoukal JV, Katayama H, Bantis LE, Wang H, Kundnani DL, et al. Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity. *Nat Commun* 2019 Jan 16; 10(1): 254.
103. Li D, Liu J, Guo B, Liang C, Dang L, Lu C, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat Commun* 2016 Mar 7; 7: 10872.
104. Zhou Y, Liu Y, Xu G, Liu L, Li H, Li Y, et al. Human breast milk-derived exosomes through inhibiting AT II cell apoptosis to prevent bronchopulmonary dysplasia in rat lung. *J Cell Mol Med* 2022 Aug; 26(15): 4169-4182.
105. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018 Nov 23; 7(1): 1535750.
106. 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 May; 16(5): 538-48.
107. Stocker JT. Pathologic features of long-standing "healed" bronchopulmonary dysplasia: a study of 28 3- to 40-month-old infants. *Hum Pathol* 1986 Sep; 17(9): 943-61.
108. Ozer E, Sis B, Ozen E, Sakizli M, Canda T, Sarioğlu S. BRCA1, C-erbB-2, and H-ras gene expressions in young women with breast cancer. An immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000 Mar; 8(1): 12-8.
109. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004 Apr; 37(4): 277-85.
110. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005 Dec; 38(12): 1103-11.
111. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003 Feb; 8(1): 39-49.

- 112.Özdemir ÖM, Gözkeser E, Bir F, Yenisey Ç. The effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Pediatr Neonatol* 2014 Oct;55(5):352-7.
- 113.Wilborn AM, Evers LB, Canada AT. Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species. *Pediatr Res* 1996 Aug;40(2):225-32.
- 114.de Almeida VO, Pereira RA, Amantéa SL, Rhoden CR, Colvero MO. Neonatal diseases and oxidative stress in premature infants: an integrative review. *J Pediatr (Rio J)* 2022 Sep-Oct;98(5):455-462.
- 115.Cannavò L, Perrone S, Viola V, Marseglia L, Di Rosa G, Gitto E. Oxidative Stress and Respiratory Diseases in Preterm Newborns. *Int J Mol Sci* 2021 Nov 19;22(22):12504.
- 116.Ozdemir R, Demirtas G, Parlakpinar H, Polat A, Tanbag K, Taslidere E, et al. Dexpanthenol therapy reduces lung damage in a hyperoxic lung injury in neonatal rats. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(11):1801-7.