

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DENEYSEL BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNDE
HİPOTERMİ TEDAVİSİ

DR. CEM ALTINSOY

İZMİR 2011

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DENEYSEL BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNDE
HİPOTERMİ TEDAVİSİ

DR. CEM ALTINSOY

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF.DR.NURAY DUMAN

İZMİR 2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim, tez konumun sečilmesi ve çalıőmalarımın yürütölmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen tez danıőmanım Prof. Dr. Nuray Duman'a; eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine; eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren ailem ile tüm çalıőma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Cem Altınsoy
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı Uzmanlık Öğrencisi

İzmir 2011

| İÇİNDEKİLER | SAYFA NO |
|--|-----------------|
| TABLO LİSTESİ | II |
| RESİM LİSTESİ | III |
| KISALTMALAR..... | IV |
| ÖZET | V |
| SUMMARY | VI |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.A.KRONİK AKCİĞER HASTALIĞI..... | 2 |
| 2.A.1 Tanım | 2 |
| 2.A.2 Tarihçe..... | 2 |
| 2.A.3 Görülme sıklığı | 3 |
| 2.A.4 Patofizyoloji..... | 3 |
| 2.A.5 Etyoloji / risk faktörleri | 6 |
| 2.A.6 Klinik bulgular ve prognoz..... | 8 |
| 2.A.7 Korunma | 9 |
| 2.A.8. Tedavi..... | 12 |
| 2.B.HİPOTERMİ | 13 |
| 2.B.1. Tanımı ve sınıflandırılması..... | 13 |
| 2.B.2. Biyolojik fonksiyonları..... | 14 |
| 2.B.3. Medikal uygulamalar | 16 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 18 |
| 3.1 Hayvan modeli ve tedaviler..... | 18 |
| 3.2 Doku hazırlığı | 19 |
| 3.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi | 19 |
| 3.4 Alveolar alanın morfometrik ölçümü..... | 19 |
| 3.5 Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi | 20 |
| 3.6 Sitokin gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi | 20 |
| 3.7 Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler | 20 |
| 4.BULGULAR | 21 |
| 5.TARTIŞMA | 39 |
| 6.SONUÇLAR | 42 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 43 |
| 8. EK 1:ETİK KURUL ONAYI..... | 51 |

TABLO LİSTESİ**SAYFA NO**

| | |
|---|----|
| Tablo 1: Bronkopulmoner displazi tanısal kriterlerinin tanımlanması | 2 |
| Tablo 2: BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler | 5 |
| Tablo 3: BPD'nin prognozu..... | 9 |
| Tablo 4: Alveolar yüzey ölçümünün değerlendirilmesi | 22 |
| Tablo 5: Fibrozisin histolojik değerlendirilmesinin karşılaştırılması..... | 23 |
| Tablo 6: α -SMA immunhistokimyasal boyama sonuçlarının karşılaştırılması..... | 24 |
| Tablo 7: Aktive kaspaz-3 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi | 25 |
| Tablo 8: M30 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi | 26 |
| Tablo 9: Sitokin gen ekspresyonunun değerlendirilmesi | 38 |

RESİM LİSTESİ

SAYFA NO

| | |
|---|----|
| Resim 1: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu (20x H.E boyama) | 27 |
| Resim 2: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu (40x H.E boyama) | 27 |
| Resim 3: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu (40x H.E boyama) | 28 |
| Resim 4: LPS grubuna ait akciğer dokusu (40x H.E boyama)..... | 28 |
| Resim 5: LPS grubuna ait akciğer dokusu (100x H.E boyama)..... | 29 |
| Resim 6: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu (40x H.E boyama)..... | 29 |
| Resim 7: Kontrol grubuna ait akciğer dokusu (100x Azan Trikom boyama) | 30 |
| Resim 8: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu (100x Azan Trikom boyama) | 30 |
| Resim 9: LPS grubuna ait akciğer dokusu (100x Azan Trikom boyama) | 31 |
| Resim 10: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu (100x Azan Trikom boyama) | 31 |
| Resim 11: Kontrol grubuna ait α -SMA immunreaktivitesi..... | 32 |
| Resim 12: Hipotermi grubuna ait α -SMA immunreaktivitesi..... | 32 |
| Resim 13: LPS grubuna ait α -SMA immunreaktivitesi | 33 |
| Resim 14: LPS+Hipotermi α -SMA immunreaktivitesi..... | 33 |
| Resim 15: Kontrol grubuna ait aktive kaspaz -3 immunreaktivitesi | 34 |
| Resim 16: Hipotermi grubuna ait aktive kaspaz-3 immunreaktivitesi..... | 34 |
| Resim 17: LPS grubuna ait aktive kaspaz-3 immunreaktivitesi..... | 35 |
| Resim 18: LPS+Hipotermi grubuna ait aktive kaspaz-3 immunreaktivitesi..... | 35 |
| Resim 19: Kontrol grubuna ait M30 immunreaktivitesi | 36 |
| Resim 20: Hipotermi grubuna ait M30 immunreaktivitesi | 36 |
| Resim 21: LPS grubuna ait M30 immunreaktivitesi | 37 |
| Resim 22: LPS grubuna ait M30 immunreaktivitesi | 37 |

KISALTMALAR

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| BPD | : | Bronkopulmoner Displazi |
| EPCR | : | Endoteliyal Protein C Reseptörü |
| GH | : | Gestasyonel Hafta |
| IL1-β | : | İnterlökin 1 beta |
| IL-1 | : | İnterlökin 1 |
| IL-6 | : | İnterlökin 6 |
| IL-8 | : | İnterlökin 8 |
| PDA | : | Patent Duktus Arteriozus |
| PDGF | : | Platelet Derived Growth Factor |
| RDS | : | Respiratuar Distres Sendromu |
| TGF-β | : | Transforming Growth Factor $-\beta$ |
| TGF-α | : | Transforming Growth Factor $-\alpha$ |
| TNFα | : | Tümör Nekrozis Faktör alfa |
| VEGF | : | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| HİE | : | Hipoksik İskemik Ensefalopati |
| ACE | : | Anjitenzin Konverting Enzim |
| ELBW | : | Düşük Doğum Ağırlıklı Bebek |
| HFOV | : | Yüksek Frekanslı Ossilatuar Ventilasyon |
| NCPAP | : | Nazal devamlı pozitif havayolu basıncı |
| Cu | : | Bakır |
| Zn | : | Çinko |
| NMDA | : | N-methyl D-aspartate |
| BDNF | : | Brain-derived nörotrofik faktör |
| NFκB | : | Nükleer faktör kappa B |
| Bcl-2 | : | B-cell lymphoma 2 |
| TNFR1 | : | Tümör nekrozis faktör reseptör 1 |
| AP-1 | : | Activator protein 1 |
| İCAM-1 | : | intraseluler adezyon molekülü 1 |
| TCA: | : | Trikarboksilik Asit |
| LPS | : | Lipopolisakkarit |
| SMA | : | düz kas aktin |
| PBS | : | Phosphate-buffered saline |
| PCR | : | Protein zincir reaksiyonu |
| RNA | : | Ribonükleik asit |
| ALİ | : | Akut akciğer hasarı |

DENEYSEL BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNDE HİPOTERMİ TEDAVİSİ

ÖZET

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm bebeklerin en önemli morbiditelerinden biri olup, akciğer dokusunda inflamasyon, fibrozis ve gelişim bozukluğu ve/veya duraklaması sonucunda gelişmektedir. Günümüzde bronkopulmoner displazi gelişimini önlemekte başarılı tek bir yöntem yoktur. Hipoterminin teröpatik olarak kullanımı uzun yıllardır bilinmekte olup enerji metabolizması, inflamasyon, apoptozis, oksidan sistem üzerinden etki göstermektedir. Terapötik hipotermi neonatal hipoksik iskemik ensefalopati tedavisinde rutin kullanıma girmiş tek tedavi şeklidir. Çalışmamızda multifaktöryel patolojik sürecin rol oynadığı BPD'de, farklı etki mekanizmaları nedeniyle hipotermi tedavisinin etkinliğinin değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarında bulunan Wistar cinsi anne ve yavru sıçanlar kullanıldı. Çalışma grupları her grupta en az 6 yavru olacak şekilde: i. Kontrol , ii. BPD, iii. BPD + teröpatik hipotermi, iv. hipotermi grubu olarak oluşturuldu. BPD modeli oluşturmak için anne sıçanlara 19 ve 20. gebelik günlerinde intrapertoneal lipopolisakkarit (400 mikrogram/kg) uygulandı. Hipotermi grubundaki yavru sıçanlara postnatal 24. saatte başlamak üzere 24 saat süreyle rektal vücut ısısı 34 °C olacak şekilde hipotermi uygulandı. Hayvanların vücut ısıları saatlik olarak rektal ısı probu ile ölçüldü. Postnatal 7. günde tüm hayvanlar eter anestezisi ile sakrifiye edildi, torakotomi ile çıkarılan akciğerler örnekleri immunohistokimyasal incelemeler ve pro-antiinflamatuvar sitokin düzeyleri açısından değerlendirmeye alındı.

Antenatal LPS uygulanan grupta alveol yüzey alanının azaldığı, fibrotik değişikliklerin meydana geldiği, düz kas içeriğinin arttığı ve inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonlarının arttığı görüldü. Hipotermi tedavisinin, alveolar yüzey alanını arttırdığı, fibrozisi ve düz kas içeriğini azalttığı saptandı. Hipoterminin proinflamatuvar sitokin gen ekspresyon düzeylerini (İL6, TNF, İL1 α ve İL1 β) azalttığı görüldü.

Sonuç olarak, hipotermi tedavisinin, yenidoğan sıçanlarda gerçekleştirdiğimiz antenatal inflamasyonla indüklenen BPD modelinde etkin olduğu saptanmıştır. Çalışma sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi durumunda hipotermi BPD tedavisinde yeni bir seçenek olarak kullanılabilir.

SUMMARY

EFFECT OF THERAPEUTIC HYPOTHERMIA ON LPS INDUCED BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA MODEL

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is one of the most significant morbidity in preterm infants and a developmental disorder characterized by lung tissue inflammation, fibrosis. Today, there is not a unique method for successfully prevent the development of BPD. The use of therapeutic hypothermia is known for many years that show its effects by regulation of energy metabolism, inflammation, apoptosis and oxidant system. The use of therapeutic hypothermia is the only form of treatment in the neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. Our study aims to evaluate the efficacy of therapeutic hypothermia in prevention of BPD.

Twenty four wistar rat pups born from four mothers were used for this purpose. The groups were: (1) control, (2) antenatal Lipopolysaccharide (LPS) induced BPD (3) antenatal LPS induced BPD + hypothermia and (4) hypothermia. Intra-peritoneal LPS (400 µg/kg) was injected to maternal rat at 19th and 20th gestational days to establish BPD model. In hypothermia groups hypothermia started at postnatal 24th hour administered during 24 hours keeping rectal body temperature as 34 °C. Body temperatures of the rat pups measured per hour. At postnatal 7th day rats were sacrificed under ether anesthesia and their lungs were removed by thoracotomy. Lung samples were evaluated for immunohistochemical tests and proinflammatory gene expression levels .

In antenatal LPS applied group comparing with control group, alveolar surface area decreased, fibrotic changes and smooth muscle content was increased and gene expression of inflammatory cytokines were higher. Hypothermia therapy increased alveolar surface area and decreased fibrosis and smooth muscle content. Furthermore, hypothermia therapy reduced gene expression of pro-inflammatory cytokine levels (IL6, IL1 α, IL1 β, TNF-α).

Results of this study indicated that hypothermia therapy is effective in LPS induced BPD model. If these results are supported by further studies, hypothermia will be a new therapy option for preventing BPD

1. GİRİŞ VE AMAC

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm bebeklerde görülen, akciğer dokusunda inflamasyon, fibrozis ve gelişim bozukluğu ve/veya duraklaması sonucunda ortaya çıkan kronik akciğer hastalığıdır. Bronkopulmoner displazi, prematüre doğan bebeklerin tüm hayatı boyunca ciddi morbiditelere yol açar. Prematüre doğum, solunum yetmezliği, oksijen tedavisi ve mekanik ventilasyon, BPD gelişiminde dört temel risk faktörünü oluşturmaktadır (1, 2).

Bronkopulmoner displazi gelişimini önlemekte başarılı tek bir yöntem yoktur. Prematür doğumların engellenmesi, prenatal steroid tedavileri, postnatal dönemde sürfaktan, anti-inflamatuvar ajanlar, yeni mekanik ventilasyon stratejileri, antioksidan tedaviler ile hastalık şiddeti azaltılabilmektedir (3). Bronkopulmoner displazinin önlenmesi ve tedavisi konusunda araştırmalar devam etmektedir.

Bronkopulmoner displazi tedavisinde, günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Literatürde hiperoksi ile oluşturulan ve “yeni BPD”nin histolojik özelliklerini gösteren modellerde, tedavi etkinliğini değerlendiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç; hipotermi tedavisinin yenidoğanın akciğer hasarının giderilmesindeki etkinliğini, histopatolojik düzeyde değerlendirmektir.

Günümüzde hipotermi en önemli nöroprotektif tedavi şeklidir. Hipotermi kardiyak arrest sonrası, travmatik beyin hasarı, spinal kord hasarı ve serebrovasküler olay gibi beyini etkileyen durumlarda akut karaciğer hasarında ve hipoksik iskemik ensefalopati gibi klinik durumlarda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hipotermimin metabolizmayı her bir derece için ortalama %5 azalttığı saptanmıştır (3). Hipotermi hücrel gaz değişimini, oksijen radikal üretimini, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin kullanımını, lipid peroksidasyonunu azaltır ve inflamatuvar cevabı baskılar. Ek olarak apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (4). Hipotermi tedavisi yapılan hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) modellerinde organ hasarını ve mortaliteyi azalttığı görülmüştür. Term yenidoğanın HİE tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi şeklidir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, multifaktöryel patolojik sürecin rol oynadığı yeni BPD’de, farklı etki mekanizmaları nedeniyle hipotermi tedavisinin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.A.Kronik Akciğer Hastalığı

2.A.1 Tanım

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yapılan ulusal düzeyde bir çalışma sonucunda günümüzde de geçerli olan BPD tanımı ortaya çıkmıştır (Tablo 1) (1-3).

Tablo 1. Bronkopulmoner displazi tanısal kriterlerinin tanımlanması

| | Gestasyonel hafta (GH) | |
|--------------------------------|--|--|
| | < 32 hafta | ≥ 32 hafta |
| Değerlendirme zamanı | 36. GH veya taburculuk* | Postnatal >28 gün ve <56 gün veya taburculuk* |
| BPD şiddeti^a | | |
| Hafif | Oda havası soluma | Oda havası soluma |
| Orta | <%30 oksijen ihtiyacı | <%30 oksijen ihtiyacı |
| Ağır | ≥%30 oksijen ve/veya pozitif basınçlı ventilasyon ihtiyacı | ≥%30 oksijen ve/veya pozitif basınçlı ventilasyon ihtiyacı |

^a Tüm infanlar en az 28 gün süreyle oksijen (FiO₂ > %21) tedavisi almış olup süregelen solunum sıkıntısı bulguları göstermelidir.

* Hangisi daha önce olursa

2.A.2 Tarihçe

Bronkopulmoner displazideki tarihsel gelişime baktığımızda; Northway ve arkadaşları 1967 yılında, ağır RDS gelişen prematüre bebeklerde, altı günü aşan sürede aralıklı pozitif basınçlı mekanik ventilasyon ve yüksek konsantrasyonda oksijen tedavisi sonrası ortaya çıkan yeni bir kronik akciğer hastalığı olarak BPD'yi tanımladı (4). Amerika Birleşik Devletleri'nde

2000 yılında yapılan ulusal bir çalışmanın sonucunda günümüzde de geçerli olan BPD tanımı ortaya çıktı (Tablo 1) (5).

2.A.3 Görülme Sıklığı

Değişik toplumların hastalığa duyarlılığı, tedavide uygulanan farklı protokoller ve uzun yıllar boyunca hastalığın yerleşik bir tanımlaması olmamasından dolayı literatürde bildirilen BPD görülme sıklığı değişkenlik göstermektedir. Buna rağmen BPD erken bebeklik döneminin en sık görülen kronik akciğer hastalığıdır (6).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ulusal bilgi açısından elde edilen bilgilere göre 1995–1996 yıllarında 500–1500 g doğum ağırlığına sahip bebeklerin %3-43'ünün 36. gestasyonel haftada (GH) oksijen gereksinimi olduğu bildirilmiştir (3). Hastanede yatış sırasında en az 28 gün süreyle oksijen ihtiyacı olan bebeklerde hastalığın, doğum ağırlığı 500–750 g arasında olanlarda % 67; 1251–1500 g arasında olanlarda ise % 1 oranında olduğu saptanmıştır (7).

Ülkemizde BPD insidansı; Dokuz Eylül Üniversitesi'nden % 2, İnönü Üniversitesi'nden % 4,2, Ankara Üniversitesi'nden % 10,5, Uludağ Üniversitesi'nden ise % 13 olarak bildirilmiştir (8-11). İnsidansların geniş bir aralıkta bildirilmesi BPD tanımı, hasta takibi ve çok düşük doğum ağırlıklı prematürelerin oranlarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (1).

2.A.4 Patofizyoloji

2.A.4.1 Normal akciğer gelişimi

Akciğer gelişimi mekanik ve humoral birçok faktörden etkilenir. Mevcut bilgiler ışığında insanlarda akciğer gelişimi aşağıda belirtilen beş bölüme ayrılabilir (12, 13).

1. *Embriyonik dönem (Konsepsiyon sonrası 26. gün ile yedinci gestasyonel hafta arası):* Primordial ön bağırsaktan köken alan bir ventral divertikülün, proksimal trakeayı oluşturmak için kaudale doğru uzanır. Bu trakea, sonrasında dallanıp her iki akciğere ana bronşlarını verir. Bu dönemde büyüme faktörleri önemli düzenleyici etkilere sahiptir.

2. *Psödoglandüler dönem (7 – 16. GH arası):*

Havayolunun terminal bronşioelleri oluşturmak üzere gelişimi ve solunumsal epitelyal hücrelerin oluşumu belirgindir.

3. *Kanaliküler dönem (16–26. GH arası):*

Solunumsal bronşiooller oluşur. Özellikle vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) etkisi ile mezenkimal damarlanma artar. Distal küboid epitelin tip I ve II epitel hücrelerine farklılaşması tamamlanır.

4. *Sakküler dönem (Üçüncü trimester veya 26/28 – 32/36 GH arası):*

Pulmoner parankimin boyutlarının arttığı bu dönemde sürfaktan sistemi olgunlaşır ve apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesiyle hava boşlukları arasında yer alan bağ dokusu inceler.

5. *Alveolar dönem ve mikrovasküler matürasyon (32–36. GH’da başlar, büyük çoğunluğu doğumdan sonra meydana gelir):*

Sakküler akciğerde mevcut olan primer septanın üzerinde sekonder krestin belirmesiyle alveoller oluşur. İmmatür alveolar septanın çift kapiller tabakasının tek tabakaya dönüşmesi sonucunda mikrovasküler matürasyon gerçekleşir. Otuzikinci GH’da doğum olması durumunda akciğerlerde olgun alveollere rastlanabilir, ancak tüm alveollerin olgunlaşması 36. GH itibariyle gerçekleşir (14).

2.A.4.2 *Eski ve yeni BPD patolojisi*

Yenidoğanlara mekanik ventilasyon uygulaması başlamadan önce ağır RDS geçiren bebekler ya ölmekte ya da sekelsiz iyileşmekteydiler. Mekanik ventilasyon uygulanmaya başladıktan sonra ortaya çıkan bu hastalık ilk defa Northway ve arkadaşları tarafından 1967 yılında tanımlandı. Gelişmekte olan akciğerin havayollarında ve parankiminde hem hasar hem de kısmî onarım görüldüğü için hastalığa bronkopulmoner displazi adı verildi (4).

Bronkopulmoner displazinin klasik patolojik özellikleri sürfaktan tedavisi öncesi döneme ait olup, bozukluklar trakeobronşial ağacın her düzeyinde (bronş, bronşiol, alveol, vasküler yatak) görülmekteydi. Bronş, bronşiol ve alveolar bölgede inflamasyon, alveolar septa yıkımı, fibroproliferasyon; bronş ve bronşiol etrafında ise düz kas ve submukozal bez hiperplazisi ile mukozal skuamöz metaplazi görülmekte idi. Düz kas hipertrofisi, endotelyal hücre hiperplazisi ve azalmış arteriol sayısı vasküler yatakta görülen değişikliklerdi (2).

Günümüzde, antenatal kortikosteroidlerin yaygın kullanımı, postnatal sürfaktan ve daha az agresif mekanik ventilasyon gibi iyileştirilmiş neonatal yoğun bakım uygulamaları sonucunda, akciğer gelişimini tamamlamamış çok düşük doğum ağırlıklı prematürelerin hayatta kalma oranı artmaktadır (15). Günümüzde, BPD nedeniyle ölen bebeklerde fibrozis

daha az belirgin olup, havalanmanın tüm akciğer alanlarında daha eşit olarak dağılım gösterdiği bildirilmektedir. Büyük ve küçük havayollarında epitelyal metaplazi, düz kas hipertrofisi ve fibrozis daha az izlenmekte, bunların yerine bu hava yollarında septasyonda aksama ve akciğer gelişim dönemlerinden sakküler dönemde duraklama, alveolar döneme geçememeyi işaret eden az sayıda, ilkel ve büyük boyutta alveoller ön plana çıkmaktadır (16).

Tablo 2. BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler (12)

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

2.A.4.3 Akciğer hasarının meydana geliş şekilleri

Bronkopulmoner displazi gelişim sürecinde önemli etkisi olan dört ana mekanizmadan etkilenir. Bunlar; inflamasyon, yapısal bozukluklar, fibroproliferasyon ve gelişim bozulması ve/veya gecikmesidir. Bunların bir kısmı (inflamasyon, yapısal bozukluklar) eski BPD’de daha aktif rol alırken, gelişim bozulması ve/veya gecikmesi yeni BPD’de daha ön plandadır. Ancak BPD olgularında değişen oranlarda her bileşenin katkısı bulunmaktadır (2).

1. *İnflamasyon*

Yenidoğan akciğer hasarı modellerinde BPD patogenezinde çeşitli inflamatuvar hücrelerin ve aracılardan rol oynadığı görülmüştür (17). İnflamatuvar hücrelerden özellikle nötrofillerin önemli rol oynadığı, hiperoksik akciğer hasarı geliştirilen nötrofilden yoksun hayvanlarda hiperoksinin daha az hasar verdiği gözlenmiştir (18-19). TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi

sitokinler ve lökotrien, tromboksan ve kompleman gibi sitokin dışı proinflamatuvar maddeler BPD gelişimi ile yakından ilişkili bulunmuştur (18-20).

2. *Yapısal bozukluklar*

Nötrofillerin salgıladıkları reaktif oksijen türleri ve proteazlar ile akciğer parankiminin çeşitli bölgelerinde hücre hasarı ve yıkımına yol açtıkları bilinmektedir (2).

3. *Fibroproliferasyon*

Bronkopulmoner displazide fibrozisin ortaya çıkış şekli devam eden araştırmaların konusudur. Fibrojenik büyüme faktörü olan TGF- β 'nin aşırı üretildiği hayvan modelinde, fibrotik etkisine ek olarak akciğer gelişimi üzerine de inhibitör etkisi olduğu görülmüştür.

4. *Gelişim bozulması/gecikmesi*

Belirgin inflamasyon ve fibrozis bulgusu olmaksızın akciğer gelişiminde duraklama olması yeni BPD'nin başlıca özelliklerindedir (5). Fizyolojik gelişim sürecinde endojen glikokortikoidler ve retinoidler akciğer gelişimini olumlu yönde etkilerken, TGF- β 'nin inhibitör etkisi de değişimin dengede tutulmasına katkıda bulunur (2, 5).

5. *Damarsal gelişim bozukluğu*

Normal akciğer oluşumu için distal epitel ve kapiller ağ gelişiminin koordine ilerlemesi çok önemlidir. Birçok BPD modelinde damarsal gelişimin bozulduğu, VEGF ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (21).

Deneysel hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, hiperoksi, hipoksi, mekanik ventilasyon ve yetersiz beslenme gibi birçok faktörün etkisinin hangi ortak son yol aracılığı ile olduğu net olarak bilinmese de, sonuçta akciğer septasyonunu azalttığı görülmüştür. TNF- α , TGF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin aşırı salgılanması, fizyolojik dozlardan daha fazla glikokortikoid uygulanması, VEGF ekspresyonunun azalması ve angiogenezisin inhibisyonu gibi faktörler alveoler gelişimin bozulmasına neden olmaktadır (2, 5, 13).

2.A.5 Etiyoloji / Risk Faktörleri

Bronkopulmoner displazi gelişimi karmaşık ve birçok etkene açık bir süreçtir. Bu sürece etki eden etyolojik ajanlarla ilgili ayrıntılı bilgilerin çoğuna ulaşılmasını sağlayan hayvan deneyleri sonucunda; hastalık daha ilk tanımlandığında risk faktörü olarak vurgulanmış olan prematür doğum, oksijen ve mekanik ventilasyonun tedavilerinin ana risk faktörleri olduğu görülmüştür (2, 4).

Bu faktörler;

1. *Prematür doğum:*

Her ne kadar zamanında doğan bebeklerde de mekanik ventilasyon veya oksijen uygulaması sonucu BPD görülebilse de hastalık çoğunlukla immatür, gelişim basamaklarından sakküler evreye yeni geçmiş akciğere sahip prematüre bebeklerde görülür (2).

2. *Oksijen:*

Oksijen organizma için hayati bir gereksinimdir. Ancak, tıbbi nedenler ile oksijen uygulamasının akciğer üzerine hasarlı etkileri hem insan hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Yenidoğan hayvanlara sadece oksijen uygulaması sonucunda bile BPD patolojisi ile çok benzer bulgular elde edilmiştir. Verilen oksijenin düzeyi arttıkça ortaya çıkan hasarın boyutu da artmaktadır (22). Hiperoksi, hem hücre içi reaktif oksijen türevlerini arttırarak, hem de konağın hiperoksiye inflamasyon ve stres cevabına neden olarak akciğer hasarı yapmaktadır. Kemirgenlerde % 100 oksijen uygulandığında alveol-kapiller bariyerin bozulduğu, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştiği görülmüştür (23). Hiperoksinin distal havayolu dallanmasında duraklamaya apoptozu arttırarak neden olduğu öne sürülmüştür (24). Prematüre yenidoğanlarda doğumda antioksidan düzeylerinin oksijen toksisitesine engel olacak miktarda bulunmadığı bilinmektedir (22).

3. *Mekanik ventilasyon:*

Yenidoğanlarda solunum sıkıntısı olduğunda kaçınılmaz tedavi yöntemi olan mekanik ventilasyon, aynı zamanda, yüksek basınçlar nedeniyle barotravma, akciğer hacminin artmasıyla volütravma, yetersiz sürfaktana sahip alveollerde tekrarlayan açılma ve kapanmalar yapmasıyla atelektotravma ve sonuçta artmış proinflamatuvar sitokinler nedeniyle biyotravmaya yol açarak akciğer hasarına neden olur (2, 23).

4. *Enfeksiyon:*

Hem prenatal hem de postnatal enfeksiyonların BPD riskini arttırdığı görülmüştür. Düşük şiddette, asendan gelişen koryoamnionit hem erken doğuma yol açmakta hem de mekanik ventilasyon veya oksijen tedavisi almayan bebeklerde pulmoner inflamasyona neden olarak BPD riskini arttırmaktadır (17, 25).

5. *Genetik:*

Genetik özellikler bazı bebeklerde BPD riskini arttırmakta veya BPD gelişiminde daha ağır seyretmesine neden olmaktadır. Prematüre bebeklerin havayolu fonksiyonlarında cinsiyet ve ırksal farklılıklar tanımlanmıştır. HLA-A2 ve ailede astım öyküsü varlığı, BPD gelişimi veya şiddeti ile ilişkilidir (2, 16). Sürfaktan protein A geni ve sürfaktan protein B geni intron 4 bölgesindeki polimorfizm ile sürfaktan protein C geni dominant mutasyonlarının BPD varlığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (26). Ek olarak, ACE geninde saptanan polimorfizmin BPD sıklığı ve şiddeti ile ilişkili olduğu görülmüştür (27).

6. *Diğer etkenler:*

Semptomatik PDA'nın BPD gelişimine katkısı olduğu görülmüştür (28). Akciğerlerin yaşa göre beklenenden küçük olması, annenin gebelik döneminde sigara kullanması da BPD açısından risk arttırıcı diğer etmenler olarak tanımlanmıştır (29).

2.A.6 Klinik Bulgular ve Prognoz

Mekanik ventilasyon öncesi dönemde, RDS'li infantlar ölmekte veya solunum sıkıntısı olmaksızın iyileşmekteydi (4). Sürfaktan ve antenatal steroid uygulaması ile BPD epidemiyolojisi, patolojisi ve kliniği belirgin olarak değişmiştir (3).

Günümüzde BPD'li infantların yaklaşık üçte ikisinin doğum ağırlığı 1,000 gramdan az ve doğum haftası 28 haftanın altındadır. Bu infantların postnatal dönemde solunum desteği almasının nedeni ağır RDS'den daha sık olarak, apne ve yetersiz solunum çabasıdır. Patent duktus arteriozus, pnömoni veya sepsis, solunum desteği süresini uzatan ve inflamasyonu arttıran faktörler olarak öne çıkmaktadır (6).

Günümüzde Northway ve arkadaşlarının tanımladığı radyolojik görünüm karışımına nadir olarak çıkmaktadır (4). Bunun yerine, akciğer grafisinde atelektazi, havalanma artışı alanları, çizgisel interstisyel opasiteler ve kistik alanlar görülebilmektedir (30).

Hastalığın kısa ve uzun dönemde istenmeyen sonuçları mevcuttur (Tablo 3). Özellikle persistan BPD bulguları gösteren bebeklerde hayatın ilk birkaç yılında solunum yolu enfeksiyonlarından dolayı hastaneye yatış sıklığı artmaktadır. Nörogelişimsel süreç açısından prematüre doğum tek başına bir risk faktörü olmakla birlikte, bazı çalışmalar BPD varlığının bu sürece olumsuz katkısı olduğunu düşündürmektedir. Sürfaktan tedavisi sonrası dönemde mortalite azalmakla birlikte hastalığın kendisi ve komplikasyonları günümüzde de mortalitenin önemli sebeplerinden olmaya devam etmektedir (2, 4).

Tablo 3. BPD'nin prognozu

| | |
|------------------|---|
| Yenidoğan dönemi | Uzamış mekanik ventilasyon ve oksijen desteği |
| | Havayolu reaktivitesi |
| | Pulmoner hipertansiyon |
| | Sistemik hipertansiyon |
| | Hastanede uzamış kalım |
| | Büyüme geriliği |
| | Ölüm |
| Uzun dönem | Geç mortalite |
| | Anormal kardiyopulmoner fonksiyon |
| | Azalmış egzersiz toleransı |
| | Hastaneye tekrarlayan yatışlar |
| | Büyüme geriliği |
| | Nörogelişimsel gerilik |

2.A.7 Korunma

Bronkopulmoner displazi patogenezinin katılan birçok faktör olduğundan korunmaya yönelik multidisipliner yaklaşım gereklidir (1).

2.A.7.1 Erken doğumun önlenmesi

Yeni BPD kavramında çok düşük doğum ağırlılı prematüre bebeklerin yeri düşünüldüğünde, BPD gelişimini engellemede en uygun yaklaşımın erken doğumun önlenmesi olacağı açıktır (2).

2.A.7.2 Doğum öncesi tedaviler

Antenatal steroid kullanımı, akciğer matürasyonunu arttırması açısından önemli bir yaklaşımdır. Tekrarlayan tedavi kürlerinin zararlı etkileri nedeniyle, preterm doğum riski olan gebelere betametazon tedavisinin sadece tek kür olarak kullanılması önerilmektedir (2).

2.A.7.3 Sürfaktan tedavisi

Sürfaktan, akut akciğer hasarı tedavisinde çok başarılı olmuştur ancak prematüre bebeklerde BPD görülme sıklığına etki etmemiştir. Bu durum, BPD gelişme riski yüksek olan çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin (ELBW) hayatta kalma oranının artması ile açıklanabilir (1).

2.A.7.4 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

Postnatal glikokortikoid tedavisi ilk uygulandığında BPD sıklığını azaltmış olsa da uzun dönemde ortaya çıkan istenmeyen etkileri nedeniyle kullanılması halen tartışmalıdır (31). Ancak 7-14 gün arası başlanan steroid tedavisinin, mortalite ve BPD gelişimini, nörolojik prognozu kötü etkilemeksizin azalttığı yakın dönemde gösterilmiştir. Antienflamatuvar etkisi olan kromolin sodyum ve bronkodilatör etkisi olan salbutamol tedavisi BPD gelişimini önlemede etkisiz bulunmuştur (32).

2.A.7.5 Patent duktus arteriozusun (PDA) kapatılması

Persistan PDA'sı olan bebeklerde BPD riski yüksektir. İlaçlarla veya cerrahi olarak erken dönemde PDA kapatılması BPD riskini azaltmaktadır (1).

2.A.7.6 Sıvı tedavisi

Prematüre bebeklere günlük ihtiyaçlarından daha fazla sıvı verildiğinde BPD riski artmaktadır, ancak alması gerekenin altında sıvı kısıtlaması yapılmasının ek fayda göstereceği ise tartışmalıdır.

2.A.7.7 Enfeksiyonların tedavisi

Sepsis BPD riskini arttırmaktadır. Ancak yenidoğan döneminde *U. urealyticum* gibi BPD ile ilişkili mikroorganizmaların kolonizasyonunun tedavisinin BPD gelişimine olan etkisi belirsizdir (2).

2.A.7.8 Mekanik ventilasyon uygulamaları

Günümüzde gelişmiş bakım ve tedavi şartları sonucunda prematüre bebeklerin hayatta kalma oranı artmaktadır. Bu infantlarda sık kullanılan, bronkopulmoner displazi gelişiminde önemli risk faktörü olan mekanik ventilasyonun farklı uygulama tekniklerinin sonuçları araştırılmaktadır.

Yüksek frekanslı ossilatuar ventilasyon (HFOV), sürekli pozitif hava yolu basıncı (nCPAP) ve permisif hiperkapni uygulamalarının BPD gelişimi sonuçlarına etkisi karşılaştırıldığında yararı olduğunu belirten yayınların yanı sıra, fark bulunmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bununla birlikte BPD gelişimini azaltan en etkili yaklaşım sürfaktan uygulamasını takiben hastanın ekstübe edilerek nCPAP'a alınmasıdır. Volüm garantili ventilasyon stratejilerinin kullanılması metaanaliz sonuçlarına göre ventilasyon süresi ve pnömotoraks sıklığını azaltmakla beraber BPD insidansını sınırda azaltmaktadır (2).

Son yıllarda yapılan çalışmalar inhale nitrik oksitin faydalı olabileceği yönündedir. Ancak olası nörolojik yan etkileri göz önüne alınarak daha ileri çalışmalar gerekmektedir (2, 33).

2.A.7.9 Antioksidan ve beslenme tedavileri

İmmatür akciğerde reaktif oksijen türevlerinin yol açtığı hasarın BPD gelişimindeki etkisi iyi bilinmektedir (23). Buradan yola çıkarak yapılan insan çalışmalarında intratrakeal Cu, Zn, süperoksit dismutaz ve intravenöz N-Asetilsistein tedavileri, BPD gelişimini önlemede beklenen etkiyi gerçekleştirememiştir. Deney hayvanlarında intravenöz metalloporfirin kullanıldığında, hiperoksik hasarın kısmen geri çevrildiği görülmüştür (33).

Prematüre bebekler sınırlı kalori ve mikronutrient deposu ile doğmaktadırlar. Yoğun kalori desteğinin BPD gelişimini önleyemediği görülmüş, ancak çeşitli mikronutrient tedavilerinden olumlu sonuçlar alınmıştır (34). Solunum yolu epiteliyal hücrelerinin bütünlüğünün sağlanması için A vitamini esansiyel özelliktedir. A vitamini eksikliği akciğer sekresyonlarının klirensinin azalmasına, trakeobronşiyal epitelde sıvı homeostazının bozulmasına, silia kaybına, akciğer hasarlanmasının tamirinin yetersiz olmasına ve sonuç olarak akciğer kompliyansında azalmaya yol açar. ELBW infantların serum ve doku retinol düzeyleri düşük olduğundan 1000g altı bebeklere 5000 U/ doz, IM, haftada 3 gün ve toplam 12 doz olacak şekilde ilk haftadan itibaren kullanılan A vitamininin BPD insidansını azalttığı gösterilmiştir (33).

2.A.7.10 Umut verici yaklaşımlar

Henüz birkaç çalışma ile yararlı olduğu gösterilen ancak çok merkezli klinik çalışmalar ile desteklenmesi gereken yaklaşımlar arasında inositol desteği, proteinaz inhibitörleri, antisitokin tedavileri, rekombinant superoksit dismutaz ve gen tedavisi sayılabilir (2, 33).

2.A.8. Tedavi

Günümüzde, BPD tedavisinde kullanılan yöntemlerin çoğu bulguların azaltılmasına yönelik olup, hastalığı ortadan kaldırmamaktadır. Birçok tedavi şeklinin de kendine özgü yan etkileri olduğundan, BPD'li infantların tedavileri hastalığın şiddeti ve bireysel özellikler dikkate alınarak belirlenir.

2.A.8.1 Oksijen/Vazodilatörler

Oksijen tedavisi, hipoksik infantlarda solunumsal belirtileri geriletir ve büyümeyi destekler. Ağır BPD olgularında kliniğin bir parçası olan pulmoner hipertansiyonda, oksijenin vazodilatör etkisi ile pulmoner arter basınçları geriler. Ancak en uygun oksijen saturasyonu veya PO₂ konusunda görüş birliği yoktur. Nifedipin ve inhale nitrik oksit gibi vazodilatör ajanlar pulmoner damar direncini azaltarak oksijenizasyonun düzelmesine katkıda bulunurlar (2, 35).

2.A.8.2 Diüretikler

İnterstisyel alveolar ödemin giderilmesi amacıyla diüretikler uzun süre kullanılmıştır. Ancak faydasının akut ve sınırlı olması, metabolik yan etkilerinin varlığı ve uzun süreli kullanım sonuçları konusunda yeterli bilgi olmaması nedeniyle sistemik veya aerosol şeklinde furosemidin BPD tedavisinde rutin kullanımı önerilmemektedir (35).

2.A.8.3 Antiienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

İnhale ve sistemik bronkodilatörler BPD tedavisinde çok sık kullanılırlar. İnhalasyon β-agonist (salbutamol, izoproterenol) ve antikolinergik (ipratropium bromide) ajanlar kısa dönemde solunum fonksiyonlarında düzelme sağlarlar ancak uzun dönemde etkileri henüz araştırılmamıştır.

Sistemik metilksantinler (teofilin ve kafein) bronkodilatasyon, solunumun uyarılması, hafif diüretik etki ve antiienflamatuvar etkilere sahiptirler. Ancak uzun dönem nörolojik etkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır (2).

2.A.8.4 Mukolitikler

Randomize çalışmaları olmamakla birlikte intratrakeal veya nebulize dornase-α kullanımını BPD'de görülen mukus tıkaçlarını önlemekte başarılı görünmektedir (2).

2.A.8.5 Beslenme

Beslenmenin ve özellikle protein alımının yetersiz olması prematür akciğerin hasara yatkınlığını arttırmaktadır. Buradan hareketle beslenme dikkatle düzenlenmelidir ancak BPD'li infantlara özel bileşim ve süreye sahip bir diyet tanımlanmamıştır (2).

2.A.8.6 Glikokortikoidler

Kısa ve uzun dönemde gelişen çeşitli metabolik, nörolojik ve gastrointestinal komplikasyonlar nedeniyle glikokortikoidler tedavide rutin kullanımdan çıkmıştır (2, 33).

2.A.8.7 İkincil hastalıkların önlenmesi

Bronkopulmoner displazili infantlar aşı ile pertussis, influenza ve pnömokoksik hastalıklardan korunulabilir. Yıl içinde respiratuvar sinsityal virüs hastalıklarının sık görüldüğü dönemlerde aylık palivizumab uygulaması ile hastaneye yatış sıklığı azalmaktadır (2).

2.A.8.8 Umut verici tedaviler

Var olan tedavilerinin geliştirilmesi ve yenilerinin araştırılması hem hayvan hem de insan çalışmaları ile sürmektedir (2, 35). Neonatal hiperokside rekombinant insan VEGF tedavisinin normal akciğer yapısının kazanılmasını sağladığı görülmüştür (36). Akciğer parankiminde bulunan Endotelin 1 reseptörlerinin tezosentan ile bloke edilmesi sonucunda hiperoksik akciğer hasarı önlenmiştir. Bir peroksizom proliferatör aktivatör reseptör agonisti olan rosiglitazon, deneysel hiperoksik akciğer hasarı tedavisinde olumlu etkide bulunmuştur. Deneysel BPD'de kök hücre tedavisinin yeri henüz tartışmalıdır (37).

2.B.Hipotermi

2.B.1. Hipotermi Tanımı ve Sınıflaması

Normal vücut sıcaklığı 36 °C ile 37,5 °C arasındadır. Hipoterminin tedavide kullanılan ve kontrol edilebilen hipotermi kavramına teröpatik hipotermi denmektedir ve 4 katagoride sınıflandırılmıştır. Hafif teröpatik hipotermi 34 °C ile 35,9 °C arasında, orta teröpatik hipotermi 32 °C ile 33,9 °C arasında, ağır teröpatik hipotermi 30 °C ile 31,9 °C arasında ve derin teröpatik hipotermi 30 °C 'nin altındadır. (38)

2.B.2. Biyolojik Fonksiyonları

2.B.2.1 Nöroprotektif etki:

İskemik beyin hasarından sonra nöronal ölüme yol açan aspartat gibi eksitatör nörotransmitterler ve ekstrasellüler glutamat artar (39). Bu nörotransmitterlerin salınımı ısı bağımlıdır. Teröpatik hipotermi inhibitör etki gösterir (40). Eksitatör aminoasitler NMDA reseptörleri üzerinden etki ederek hücre içine kalsiyum akımını artırır. Artmış hücre içi kalsiyum seviyesi mitokondriyal disfonksiyona neden olur ve hücrenin yaşamak için ihtiyaç duyduğu enerji sağlanamaz, aynı zamanda artmış kalsiyum seviyeleri intrasellüler proteazları aktive eder, hücre membranlarında depolarizasyona ve eksitatör nörotransmitter salınımına neden olur (41).

Nörotrofinler bir grup nöronal büyüme ve yaşamsal faktördür. Brain-derived nörotrofik faktör (BDNF) çalışılmış en önemli nörotrofindir. BDNF mitojen aktiviteli enzimatik yol olan tirozin kinazlara etki eder ve nöronları korur. BDNF nöronal hasarın derecesine ve enfarktın ölçüsüne göre azalır (42). Hipotermi BDNF ve diğer nörotrofinlerin seviyelerini arttırarak nöronal hasarı azaltır (43).

2.B.2.2 Antiapoptotik etki:

İki çeşit hücre ölüm şekli vardır, ilki nekrotik hücre ölümü ve diğeri apoptozis olarak da bilinen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasında etkileşim sonucu oluşur (44). Teröpatik hipotermi apoptotik hücre ölümünü inhibe eder. Bunu da Bak, Bax, PUMA gibi pro-apoptotik proteinleri ve apoptotik genleri aktive eden P53 protein seviyelerini düşürerek yapar (45).

Bcl-2 ailesi bir grup apoptotik proteindir, bunlardan bazıları; Bcl-X, Bcl-W ve Bcl-2 antiapoptotik proteinler, Bak, Bax, Bok ve Bid pro-apoptotik proteinlerdir (46). Pro-apoptotik proteinler aktive olduğunda mitokondri membranlarında porlar açar, sitokrom C salınımına neden olur ve caspas sistemini aktive eder. Sonuç olarak hücre ölümü gerçekleşir. Hipotermi Bcl-2 ve sitokrom seviyelerini etkiler (47, 48).

Bir diğer apoptotik yol da TNF yoludur, TNF fas ligand, fas, TNFR1 ve 2 komplekse ve diğer birçok reseptöre bağlanır, NFkB ve AP-1 gibi pro-apoptotik transkripsiyon faktörlerini uyarır (49). Teröpatik hipotermi apoptotik TNF yolunu durdurur ve hücre ölümünü engeller (50).

Bir diğerk en büyük ve en önemli apoptotik yolda kaspas yoludur. Kaspas yolu intrinsek ve ekstrinsek yol olarak iki şekilde çalışır. İntrensek yol radyasyon, hipoksi ve substrat eksikliği gibi hücresele stres faktörleri ile aktive olur ve mitokondriden apoptoza neden olan sitokrom c salınımına neden olur. Stokrom c caspas 9 ile 3'ü aktive ederek apoptoza neden olur (51). Ekstrinsek yol Fas-FasL, TNF-TNFR1'i aktive eder ve caspas 8, 3, 6 ve 7'nin aktive olmasına neden olur. Teröpatik hipotermi kaspas yolunu güçlü bir şekilde inhibe eder (52-54).

2.B.2.3 Metabolizma üzerine etkisi:

Hipotermi hücrenin oksijen tüketimini, glukoz metabolizmasını düzenler, glukoz rezervlerini korur (55). Bu değişiklikler sonrasında hücre metabolizması, sıcaklıktaki her bir derece azalma ile ortalama %5-%6 hatta bazen %10 a kadar azalmaktadır (56).

2.B.2.4 Dolaşım üzerine etkisi:

Hipotermi fizyolojik olarak her 1 derecede kardiyak out-putu %7 ve kalp hızını azaltır (57). Derinin soğuması sistemik vasküler rezistansı ve kardiyak afterloadı artırır. Sonuç olarak santral volüm genişler ve antidiüretik hormon salınımı azalır ve renal kan akımı ve diürez artar. Hipotermi boyunca splanknik kan akımı azalır ve kardiyak out-put relatif olarak artar(58).

İskemik hasar sonrası zedelenen bölgeden güçlü vazokonstriktör etkili, trombosit agregasyonunu uyaran ve damar okluzyonuna neden olan Tromboksan A2 salınımında artış olur (59). Teröpatik hipotermi tromboksan A2 salınımını azaltır ve iskemik alandaki hipoksi azaltılmış olur (60).

2.B.2.5 Antiinflamatuvar etkisi:

Hipotermi kemik iliğinden nötrofil salınımını azaltarak dolaşımdaki nötrofil sayısını azaltır, lökosit kemotaksisini migrasyonu ve fagositozu azaltır, reaktif oksijen radikal üretimini azaltarak intrasellüler bakteri öldürülmesini inhibe eder (61-62), intrasellüler adezyon molekül İCAM-1'i azaltarak PNL infiltrasyonunu engeller (63-64). İnflamasyon sırasında makrofaj ve diğerk hücrelerden salınan sitokinleri; İL1β, İL6, NF-kB, TNF-α ve İL8 düzeylerini azaltır (65). Beraberinde anti inflamatuvar sitokin olan İL10 düzeylerini artırır (66-67). Oksijen radikalleri DNA'da, lipit membranlarda, protein ve enzimlerde hasara yol açan reaktif ürünlerdir (68). Bu

reaktif ürünler doku hasarına ve enflamasyonun daha fazla şiddetlenmesine yol açmaktadırlar. Teröpatik hipotermi oksijen radikal üretimini azaltarak inflamasyonu engeller (69).

2.B.3. Medikal uygulamalar

2.B.3.1. Kardiyak arest

Kardiyak arest sonrası hastaneye getirilen ve resüsitasyona başlanan hastalarda mortalite %50'nin üzerindedir. Klinik çalışmalarda kardiyak arrest sonrası uygulanan teröpatik hipotermi mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda kardiyak arest sonrası hastaların nörolojik etkilenmelerinin de normotermik gruba göre daha az olduğu saptanmıştır (70).

2.B.3.2 Neonatal hipoksik iskemik ensefalopati

Perinatal asfiksi sonucu oluşan hipoksik iskemik ensefalopati yenidoğanın en önemli ölüm sebebidir ve uzun dönemde nörolojik bozukluklara neden olur. Yapılan çalışmalarda hipotermi uygulanan HİE'li infantların ölüm oranı azalmış ve nörolojik gelişim bozukluğu oranlarında düşüşe neden olmuştur. Bu nedenle neonatal HİE teröpatik hipotermi tedavi protokollerine eklenmiştir (71).

2.B.3.3 Travmatik beyin hasarı

Travmatik beyin hasarında ölümcül problemler beyin ödemi ve intrakranial hipertansiyondur. Hipotermi intrakranial basıncı etkili bir şekilde düşürür. Yapılan çalışmalarda mortalite üzerine normotermik gruba göre üstünlüğü saptanmamış fakat hipotermi uygulanan hastalarda iyi kalış oranları daha yüksek saptanmıştır (72-74).

2.B.3.4 Akut karaciğer hasarı

Akut karaciğer hasarında kandaki amonyak konsantrasyonu artar ve beraberinde beyindeki amonyak düzeyi de artmaya başlar. Artmış amonyak konsantrasyonu beyin ödemi ve intrakranial basıncın artmasına neden olur (74). Sonuç olarak hastalarda hepatik ensefalopati oluşur. Teröpatik hipotermi kan beyin bariyerinden amonyağın geçişini azaltır (75). Beyin de artmış olan amonyak, glutamat salınımını arttırır, geri alımını azaltır ve ensefalit bulgularına neden olur. Hipotermi glutamat üzerinden etki ederek ensefalit bulgularını azaltır (76-77). Hiperamonyemik beyinde laktat düzeyleri artar, amonyak TCA siklusunun enzimi olan α -ketoglutarat dehidrogenaz enzimini inhibe eder ve glikolitik aktivite artar. Enerji üretimi

azaldığında N-asetilaspartat konsantrasyonları azalır, enerji üretimi azaldığı için alanin tansferaz aktivitesi artar ve laktat, amonyak oluşum yoluna ürün olarak girer. Hipotermi amonyak birikimini beyinde azalttığı için glikolitik yol kullanımı azalır ve enerji üretimi artar. Sonuç olarak hepatik ensefalopatiyi azaltır (78).

2.B.3.5. Kardiyoprotektif etki

Kardiyak cerrahi işlemlerinde hipotermi sıkça kullanılmaktadır. Hipotermi kardiyak metabolizmayı azaltmakta ve hücrelerin hipoksiye direncini arttırmaktadır. Reperfuzyon sonrası kalp dokusunda serbest oksijen radikallerini azaltarak reperfuzyon hasarını engeller.

Bronkopulmoner displazi tedavisinde, günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Literatürde inflamasyon yolu ile oluşturulan, “yeni BPD” histolojisi gösteren modellerde (79), tedavi etkinliğini değerlendiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. İn vitro, prelinik ve klinik verilerle pek çok hastalıkta teröpatik hipotermi tedavisinin kullanımının mümkün olduğu gösterilmiş olmakla beraber kronik akciğer hastalığındaki kullanımına ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Biz de bu çalışmada hipotermi tedavisinin antienflamatuar ve antiapoptotik özelliklerinden yola çıkarak BPD modelinde etkinliğini incelemeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hayvan Modeli

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu onayı alınan bu çalışma, aynı üniversitenin Deneysel Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Gebeliği planlanmış Wistar suşu gebe sıçanlar 4 gruba ayrılıp, her bir grup ayrı kafeste bulunduruldu. Doğan yavrular çalışmaya alındı, her grupta en az 6 yavru olmak üzere, canlı doğan ve annelerinin yanında tutulan toplam 24 adet yenidoğan Wistar türü rat çalışmaya alındı.

3.1.1 Çalışma grupları

Grup I (n=6) : Hipotermi uygulanan grup.

Grup II (n=6) : LPS ile BPD yapılan, hipotermi uygulanan grup

Grup III (n=6): LPS ile BPD yapılan, hipotermi uygulanmayan grup

Grup IV (n=6): Kontrol grubu

3.1.2. BPD modelinin uygulanması

Grup 2 ve 3 'te bulunan anne sıçanlara örnek literatüre uygun olarak antenatal 19. ve 20. günde intraperitoneal 0,4 mg/kg LPS enjeksiyonu üst üste 2 gün uygulandı (91,93- 96) Postnatal 21. günde doğan yavrular sakrifikasyon zamanına kadar anne yanında izlendi. Grup 1 ve 2'de bulunan yavrular hipotermi tedavisine alınırken grup 3 ve 4'de bulunanlar normal oda sıcaklığında izlendi. Postnatal 7. günde tüm hayvanlar eter anestezisi ile sakrifiye edildi, torakotomi ile akciğerleri çıkartıldı, örnekler patolojik ve sitokin düzeyleri açısından değerlendirmeye alındı.

3.1.3 Hipoterminin uygulanması

Hipotermi, etrafında ısıyı ayarlanabilen su sirkülasyonu ile soğutulan kapalı düzenekte uygulandı. Suyun soğutulması chillerle yapıldı ve ısı, üzerindeki termometre ile istenen düzeye ayarlandı. Grup 1 ve 2'deki ratlara postnatal 24. saatte başlamak üzere 24 saat süreyle rektal vücut ısı 34 °C olacak şekilde hipotermi uygulandı (92). Hayvanların vücut ısıları saatlik olarak rektal ısı probu ile aralıklı olarak ölçüldü (90).

3.2 Doku Hazırlığı

Postnatal 7. günde her bir gruptaki ratların akciğer dokusunun yarısı histopatolojik çalışma için torakotomi ile çıkarılarak fikse edilip bir gece %10'luk formalin içinde bırakıldı. Fikse edilmiş akciğer dokusunun her bir lobu ayrı ayrı kasetlere konup doku işleminin ardından

parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mm kalınlığında kesitler alındı ve iki histolog tarafından kör bir şekilde değerlendirildi.

Her dört gruptaki sakrifiye edilmiş ratların diğer yarım akciğer dokuları kuru buz içerisine alındı ve sitokin gen ekspresyonlarının değerlendirileceği güne kadar -80 °C'de saklandı.

3.3 Fibrozisin Histolojik Değerlendirmesi

Fibrozisi değerlendirmek için sağ orta ve sol loblar Mallory Azan ile boyandı. Onluk büyütme ile sıçan başına üç birbiriyle örtüşmeyen akciğer kesiti ve büyük damar ve havayollarının bulunduğu alanlar atlanarak en az 30 akciğer alanı incelendi. Her akciğer, alveolar septal fibrozis varlığı açısından değerlendirildi: Fibrozis yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi.

3.4 Alveolar Alanın Morfometrik Ölçümü

Alveolar alan, bilgisayarlı dijital histokimyasal görüntü analizi yöntemi ile akciğer parankiminin yüzdesi olarak ölçüldü. Dijital görüntüler hematoksilin-eozin boyalı kesitlerden, 40'lık büyütmede, ışık mikroskobuna (Olympus BX51, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) bağlı 3CCD renkli video kamera (Olympus DP70, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) ile elde edildi. Görüntüler daha önce tarif edilen yöntemler modifiye edilerek Mediscope Görüntü Analiz Programı (Mediscope, Dokuz Eylül Üniversitesi, Klinik Mühendislik Birimi, İzmir, Türkiye) kullanılarak işlem gördü. Her sıçanda, 10 adet büyük büyütme görüntüsü seçildi ve dijital hale getirildi. Görüntülerin büyük arteriyel, bronşiyoler veya bronşiyel yapılar içermesi durumunda, Paintbrush programı (Microsoft) kullanılarak ölçüm dışı bırakıldı.

Elde edilen her alan için, alveolar alanı gösteren beyaz alanların yüzdesi yarı otomatik olarak belirlendi. Görüntüdeki beyaz alanlar histolog tarafından belirlenip işaretlendi. Ardından sistem, aynı boyamaya sahip alanları seçip piksel birimlerine dönüştürdü ve her alan için seçilen beyaz alanların yüzde olarak oranını verdi. Histolog en uygun seçime ulaşına dek işlemi tekrarladı. On kesit alanının ortalama değerleri belirlenip alveolar alan olarak adlandırıldı.

3.5 Düz Kas Aktin Ekspresyonunun ve Apoptozisin İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Düz kas aktin (SMA) ekspresyonu avidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılarak görünür hale getirildi. Sağ kaudal ve sol lobların gömülü dokularından poly-L-lysin kaplı

camlar üzerine kesit alındı. Bu kesitler ksilen ile deparafinize edildi, distile suya batırılıp rehidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, hidrojen peroksidazın phosphate-buffered saline (PBS) içindeki %0,3'lük çözeltisi kullanılarak engellendi. Düz kas aktinine yönelik primer antikör (önceden sulandırılmış, LABVISION Corp, ABD) oda sıcaklığında 30 dakika süresince uygulandı ve PBS içinde yıkandı. Sekonder antikör streptavidin-peroksidaz kompleksi (Neomarkers, Fremont, CA), sırasıyla, 10 dakika oda sıcaklığında uygulanıp PBS'de yıkandı. Peroksidaz aktivitesi 5 dakika uygulanan %0.03 derişimde 3–3 diaminobenzidin tetrahidroklorid (Sigma Chemical Co.) ile görüntülendi. Deionize suda yıkanıp hematoksilen ile boyanan kesitler dehidrate edilip kapatıldı. Uygun doku kesitleri primer ve sekonder antikör için ayrıca pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlemde geçirildi.

Apopitozisi değerlendirilmesi için aktive kaspaz 3 ve M30 immunohistokimyasal boyama ile dokular boyandı. İmmünohistokimyasal skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen on alan rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 1'den 4'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi.

3.6 Sitokin Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Real-Time PCR aşamasında hedeflenen RNA ekspresyon düzeyini belirlemek için, ilgili gen bölgesine sipesifik primer ve probları içeren real time ready assay kullanıldı. Proenflamatuvar sitokinlerden İL1 α , İL1 β , TNF, İL6 ve antienflamatuvar İL10 gen ekspresyonu düzeyleri bakıldı. Referans gen, araştırılan genin ekspresyonunun rölatif kantitasyonunda kullanıldı. LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazının rölatif kantitasyon yazılımı data analizini second derivative ya da fit point metodu ile gerçekleştirdi. Referans gen, analiz edilen hedef genlerin ekspresyonlarının rölatif kantitasyonu için kullanıldı.

3.7 Araştırmada Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

İstatistik değerlendirme için SPSS 11,5 (Chicago, IL) programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığın yansıtan değer olarak p değeri <0,05 olarak seçildi. Deney grupları sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılarak hesaplandı. Sonuçların normal dağılıma uymaması nedeniyle non parametrik testler uygulandı. Ortalama alveolar alanların ve İmmünohistokimyasal skorların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Mann Whitney-U testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Histomorfolojik Bulgular

Deneysel bronkopulmoner displazi oluşturulan modelde hipoterminin akciğer dokusu üzerine olan etkilerinin histomorfolojik olarak incelenmesinde;

4.2. Hematoksilen&Eozin Boyama:

Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait akciğer dokusunun incelenmesinde yapısı normal olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda alveol yapılarının normal olduğu, inflamasyon, kapiller permeabilitede artma olmadığı, alveolar septumlarda kalınlaşma ve alveolar makrofaj sayılarında artış olmadığı gözlemlendi. Parankimde hemoraji, ödem ve konjesyona ait bulgular saptanmadı (Resim 1-2).

Hipotermi grubu: Alveolar septumlarda az miktarda kalınlaşma dışında kontrol grubuna benzer özellikler gözlemlendi ($p=0,262$)(Bkz. tablo 4) (Resim 3).

LPS grubu: LPS grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; yaygın akciğer hasarı gözlemlendi. Bu grupta yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu, kapiller permeabilitede artış bulundu. Alveollerin histomorfolojik olarak değerlendirilmesinde alveolar septumlarda kalınlaşma, alveolar ödem, diffuz alveolar hasar izlendi. Alveol lümeninde ve alveolar septumda alveolar makrofajlar gözlemlendi. Parankime bakıldığında ise yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon saptandı. Alveolar alandaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,006$) (Bkz tablo 4) (Resim 4-5).

LPS+Hipotermi grubu: Bu grupta ise LPS grubu ile karşılaştırıldığında LPS grubuna göre akciğer dokusunun daha iyi korunduğu gözlemlendi. Bu grupta mononükleer hücre infiltrasyonu, kapiller permeabilitede bazı alanlarda artış bulundu. Alveollerin histomorfolojik olarak değerlendirilmesinde; alveolar hasar, alveolar ödem, alveolar septumlarda kalınlaşmanın sepsis grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi. Alveolar septumda sepsis grubunda yoğun olarak görülen alveolar makrofaj daha az miktarda gözlemlendi. Parankime bakıldığında ise LPS grubunda yoğun olarak görülen yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyonda azalma saptandı. Alveolar alanda LPS grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı bir artış saptandı ($p=0,016$) (Bkz. Tablo 4) (Resim 6).

Tablo 4. Alveoler yüzey alanı ölçümünün değerlendirilmesi

| Grup | Ortalama Alveol Alanı*(mm ²) |
|---|---|
| 1.Hipotermi | 0,598±0,067 |
| 2.Hipotermi + LPS | 0,585±0,071 |
| 3.LPS | 0,468±0,040 |
| 4.Kontrol | 0,627±0,043 |
| P değeri | |
| 1-2 | 1,000 |
| 2-3 | 0,016 |
| 1-4 | 0,262 |
| 2-4 | 0,201 |
| 3-4 | 0,006 |
| *Ortalama alveol alanı ± Standart deviasyon | |

4.3. Azan-Trikrom Boyama:

Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait akciğer dokusu incelemesinde bağ doku yapısının normal olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda alveolar septumlarda kalınlaşma ve parankimal bağ dokusunda artış olmadığı gözlemlendi. (Resim 7)

Hipotermi grubu: Alveolar septumlarda az miktarda kalınlaşma dışında kontrol grubuna benzer özellikler gösterdi (Resim 8)

LPS grubu: LPS grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaygın akciğer hasarı gözlemlendi. Bu grupta alveollerin histomorfolojik olarak değerlendirilmesinde alveolar septumlarda kalınlaşma ile birlikte bağ dokusunda artış ve parankimde kollajen miktarında artış gözlemlendi. Bağ dokusundaki artış istatistiksel olarak da anlamlı saptandı (p=0,002) (Bkz tablo 5) (Resim 9).

LPS+Hipotermi grubu: Bu grupta ise LPS grubu ile karşılaştırıldığında akciğer dokusunda gözlenen bağ dokusu artışının daha az olduğu görüldü. Bu grupta, alveollerin histomorfolojik olarak değerlendirilmesinde alveolar septumlardaki kalınlaşmanın LPS grubuna göre daha az olduğu, parankimde LPS grubunda görülen bağ dokusu artışında azalma olduğu saptandı ve istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. (p=0,02) (Bkz tablo 5) (Resim 10).

Tablo 5. Fibrozisin histolojik değerlendirmesinin karşılaştırılması

| Grup | Fibrozis | | | |
|-------------------------|----------|-------|------|----------|
| | Yok | Hafif | Orta | Belirgin |
| 1.Hipotermi (n=6) | 0 | 5 | 1 | 0 |
| 2.Hipotermi + LPS (n=5) | 0 | 3 | 2 | 0 |
| 3.LPS (n=5) | 0 | 0 | 2 | 3 |
| 4.Kontrol (n=6) | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Grup karşılaştırmaları | P değeri | | | |
| 1-2 | 0,409 | | | |
| 2-3 | 0,020 | | | |
| 1-4 | 0,001 | | | |
| 2-4 | 0,002 | | | |
| 3-4 | 0,002 | | | |

4.4. İmmunhistokimyasal (α -SMA, Aktive Kaspaz-3 ve M30) boyama ile düz kas hiperplazisi ve apoptozisin değerlendirilmesi:

α -SMA, Aktive Kaspaz-3 ve M30 ile yapılan tüm immunhistokimyasal boyamalarda Kontrol ve Hipotermi gruplarında oldukça az miktarda immunreaktivite gözlemlendi, iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (her 3 boya için p=0,317) (tablo 6,7 ve 8). LPS grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yapılan semikantitatif değerlendirilmede immun pozitif boyanan hücre yoğunluğunda anlamlı artış olduğu görüldü (p=0,002) (Bkz tablo 6,7 ve 8). LPS+Hipotermi grubu LPS grubu ile karşılaştırıldığında, immunreaktivite yoğunluğunun

anlamli olarak azaldigi saptandi (α -SMA için $p=0,014$, aktive kaspaz 3 için $p= 0,020$, M30 için $p=0,015$) (Bkz tablo 6,7 ve 8) (Resim 11-22).

Tablo 6. α -SMA immunhistokimyasal boyama sonuclarinin karšılařtirilmesi

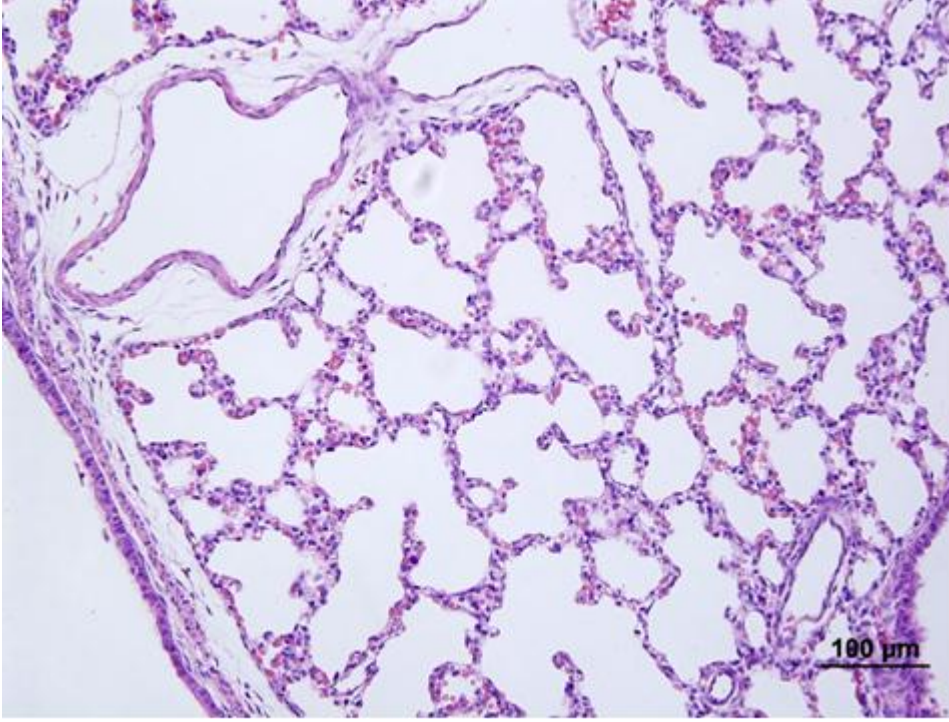
| Grup | Aktin skoru | |
|-------------------|------------------------------|--------|
| | minumum – maksimum (ortanca) | |
| 1.Hipotermi | 1,00-2,00 | (1,00) |
| 2.Hipotermi + LPS | 1,00-2,00 | (2,00) |
| 3.LPS | 2,00-3,00 | (3,00) |
| 4.Kontrol | 1,00-1,00 | (1,00) |
| P değeri | | |
| 1-4 | 0,317 | |
| 1-2 | 0,156 | |
| 2-3 | 0,014 | |
| 2-4 | 0,034 | |
| 3-4 | 0,002 | |

Tablo 7. Aktive Kaspaz-3 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

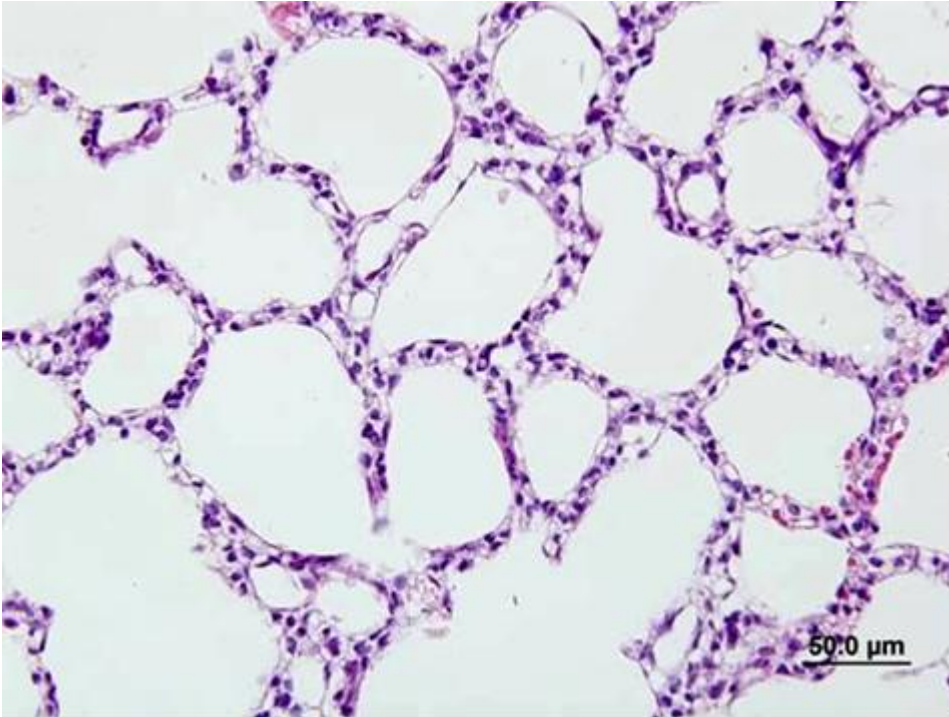
| Grup | Aktive caspas 3 skoru minumum – maksimum (ortanca) |
|-------------------|---|
| 1.Hipotermi | 1,00-2,00 (1,00) |
| 2.Hipotermi + LPS | 1,00-2,00 (1,00) |
| 3.LPS | 2,00-3,00 (3,00) |
| 4.Kontrol | 1,00-1,00 (1,00) |
| P değeri | |
| 1-4 | 0,317 |
| 1-2 | 0,409 |
| 2-3 | 0,020 |
| 2-4 | 0,102 |
| 3-4 | 0,002 |

Tablo 8.M30 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi

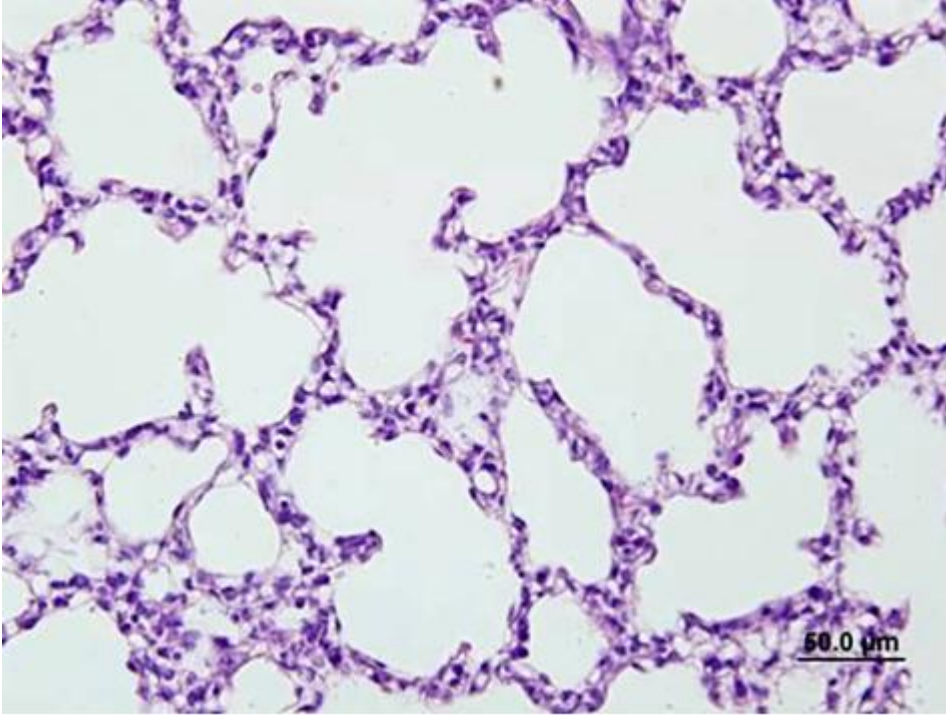
| Grup | M 30 skoru |
|-------------------|------------------------------|
| | minumum – maksimum (ortanca) |
| 1.Hipotermi | 1,00-2,00 (1,00) |
| 2.Hipotermi + LPS | 1,00-2,00 (1,00) |
| 3.LPS | 2,00-3,00 (2,00) |
| 4.Kontrol | 1,00-1,00 (1,00) |
| P değeri | |
| 1-4 | 0,317 |
| 1-2 | 0,892 |
| 2-3 | 0,015 |
| 2-4 | 0,273 |
| 3-4 | 0,002 |



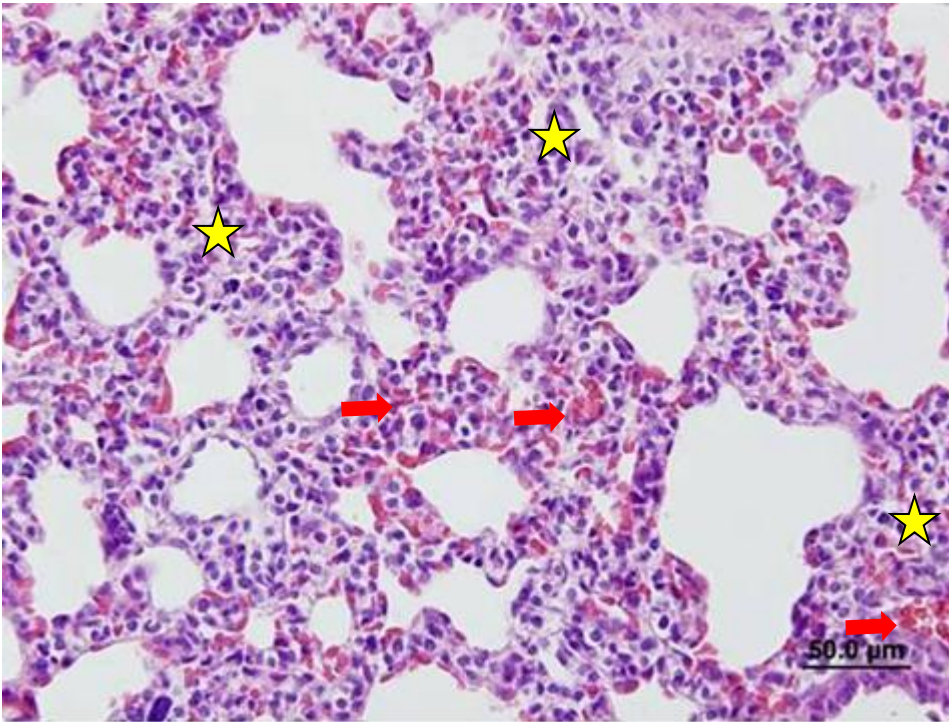
Resim 1: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu H-E x20



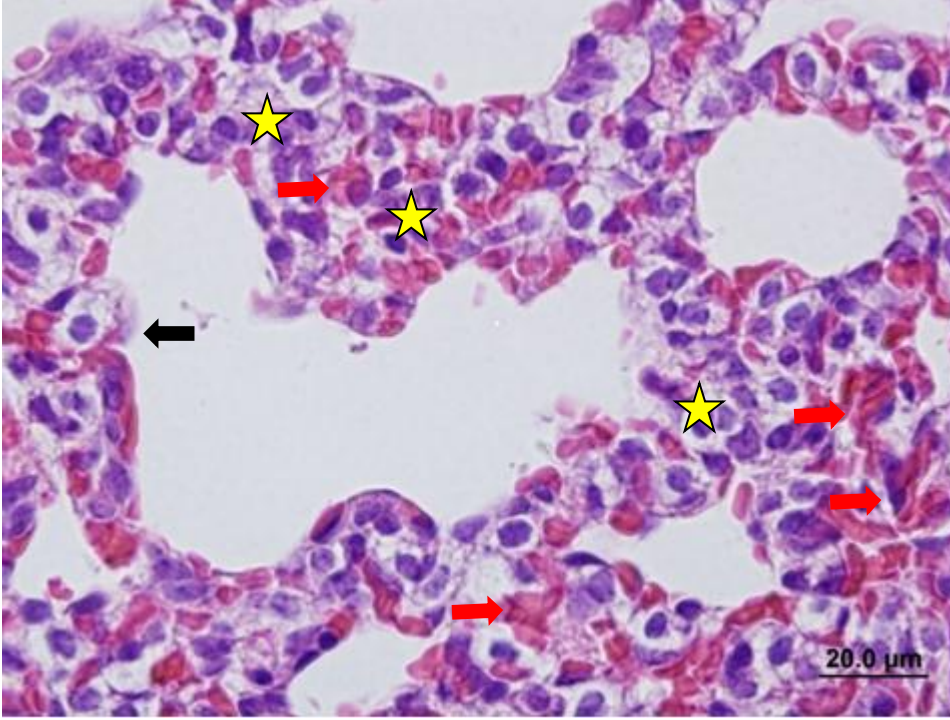
Resim 2: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu H-E x40



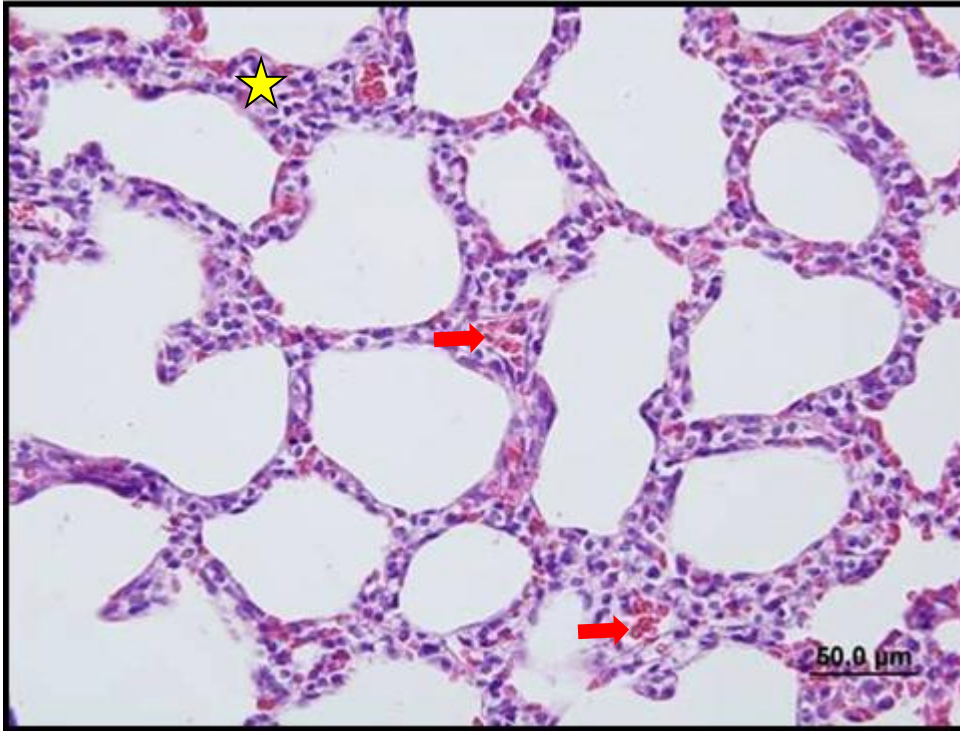
Resim 3: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu H-E x40



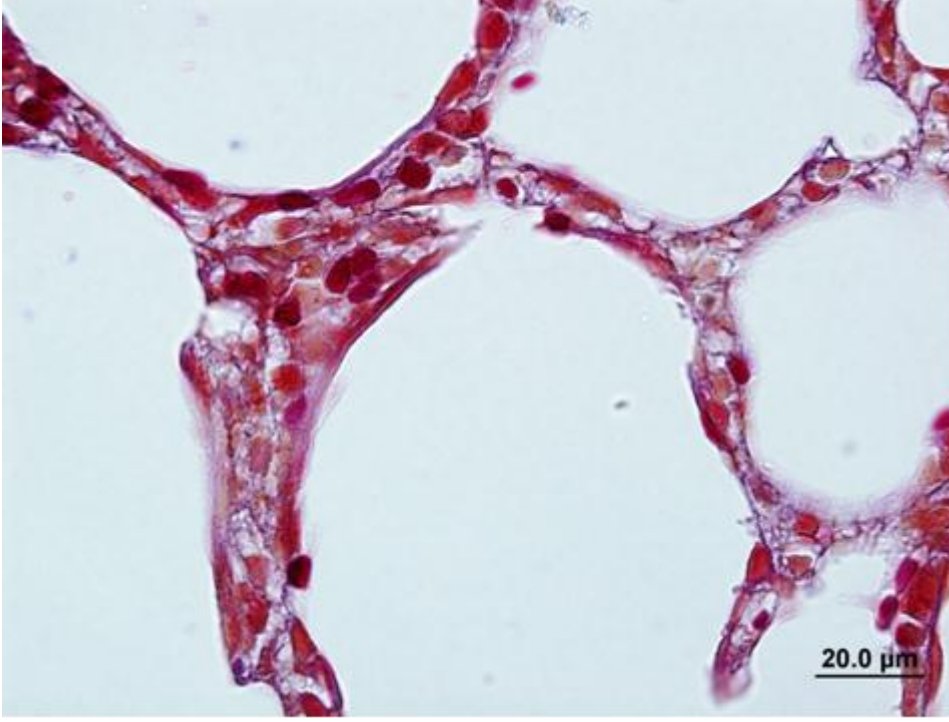
Resim 4: LPS grubuna ait akciğer dokusu; alveollerin bütünlüğü bozulmuş, alveollerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve diffüz alveolar hasar (★), kapiller permeabilitede artış ve eritrosit ekstravazasyonu (→) H-E x40



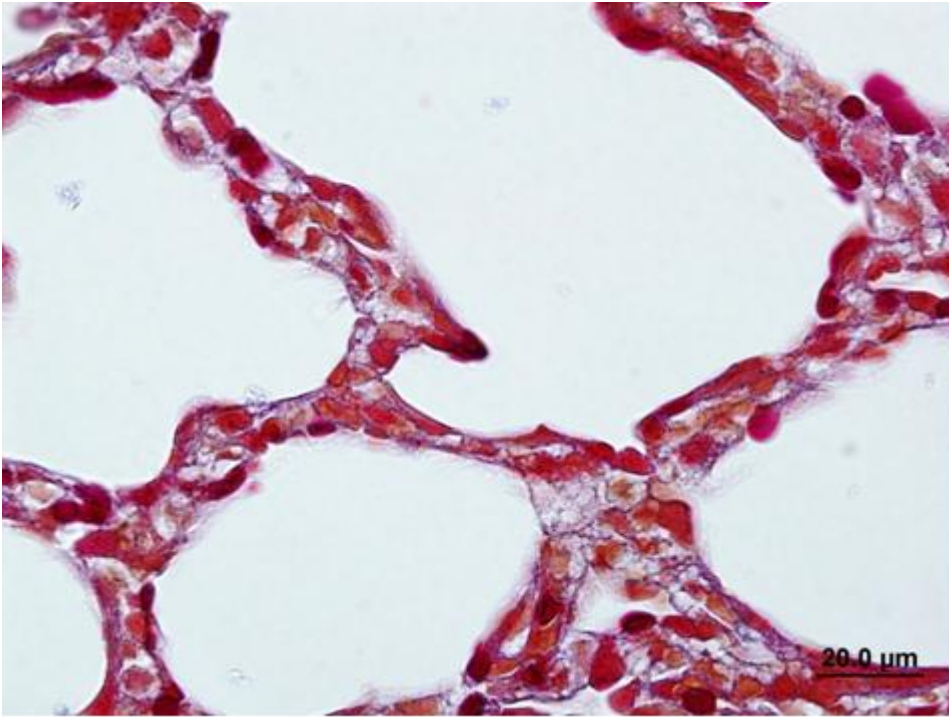
Resim 5: LPS grubuna ait akciğer dokusu; alveollerin bütünlüğü bozulmuş, alveollerde dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve diffüz alveolar hasar (★), kapiller permeabilitede artış ve eritrosit ekstravazasyonu (➡), alveolar makrofaj sayısında artış (➡) H-E 100



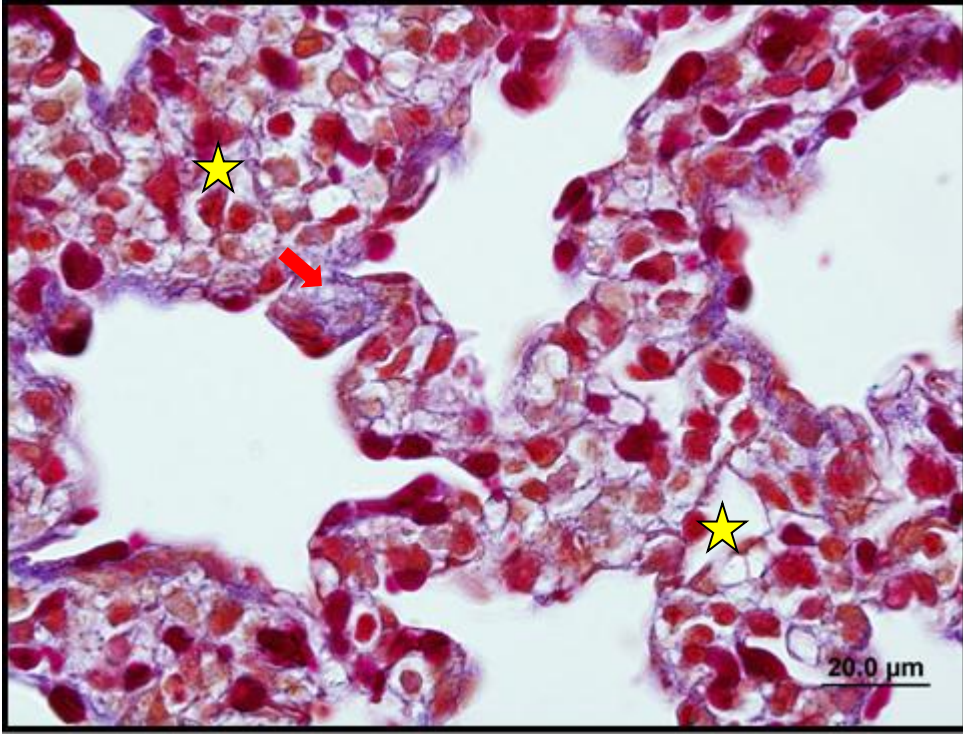
Resim 6: LPS+Hipotermi grubu akciğer dokusu. Alveollerin bütünlüğü korunmuş, alveollerde dilatasyonda, mononükleer hücre infiltrasyonu ve diffüz alveolar hasarda (★), kapiller permeabilitede ve eritrosit ekstravazasyonunda azalma (➡) H-E x40



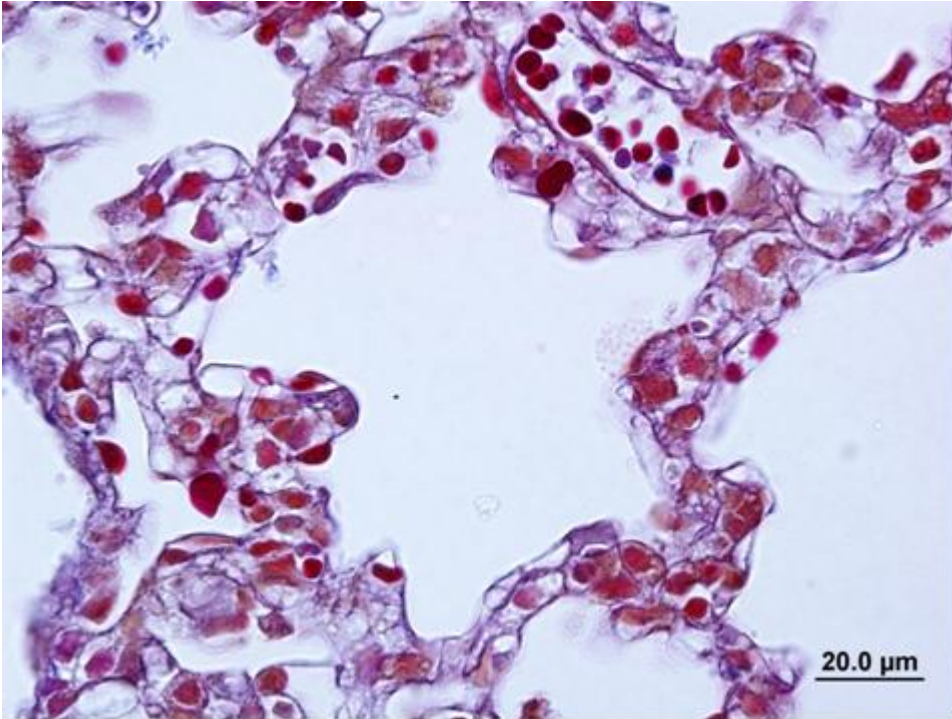
Resim 7: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu, Azan Trichrom x100



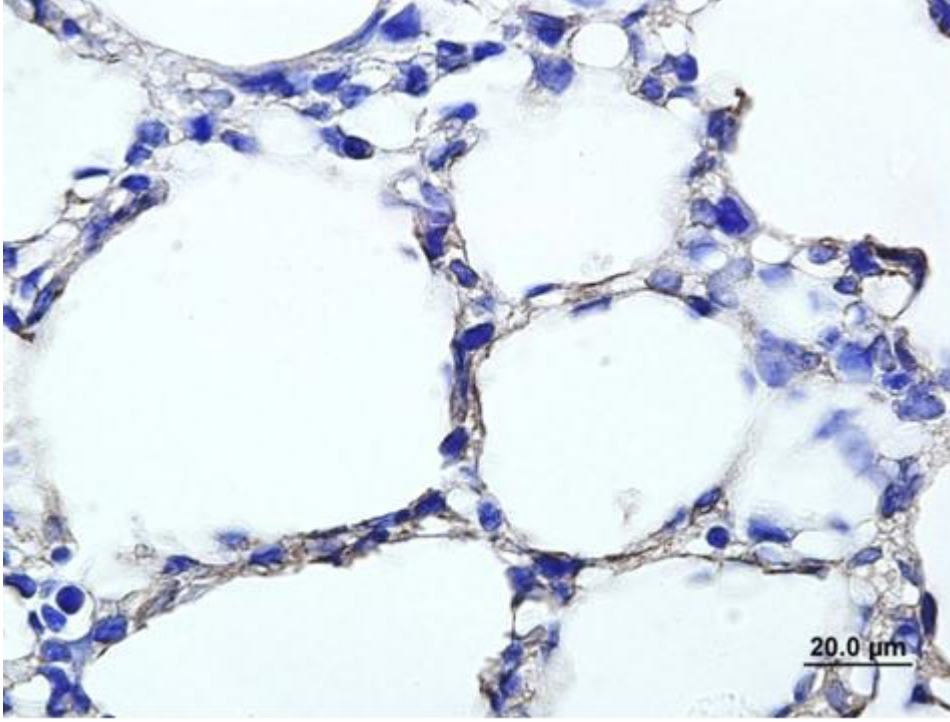
Resim 8: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, Azan Trichrom x100



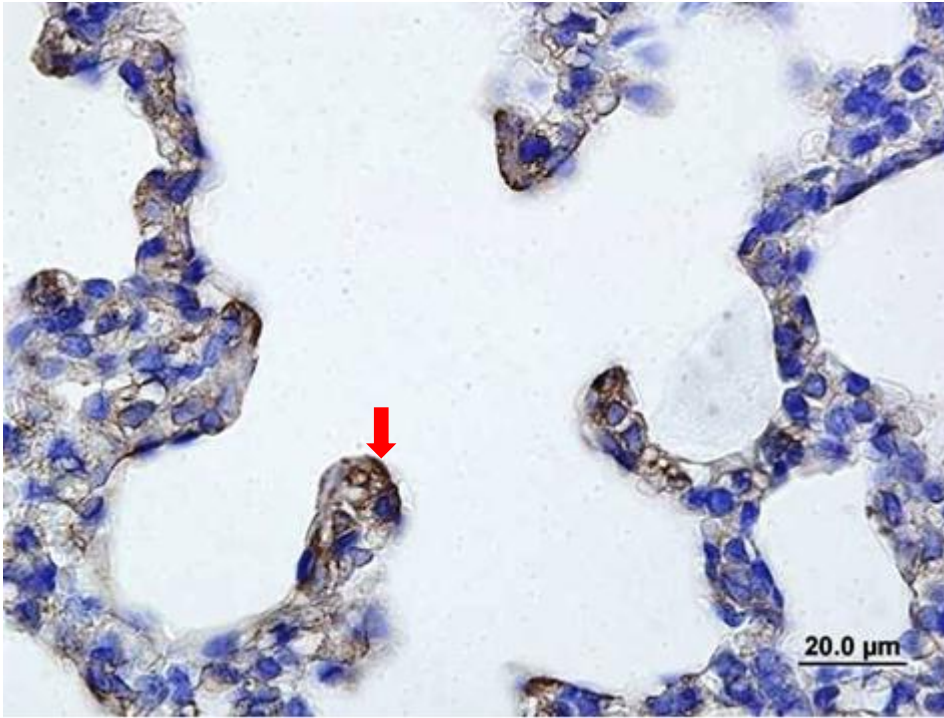
Resim 9: LPS grubuna ait akciğer dokusu; alveollerin bütünlüğünde bozulma, alveollerde dilatasyon, diffüz alveolar hasar (★) ve alveoler fibrozis (→), Azan Trichrom x100



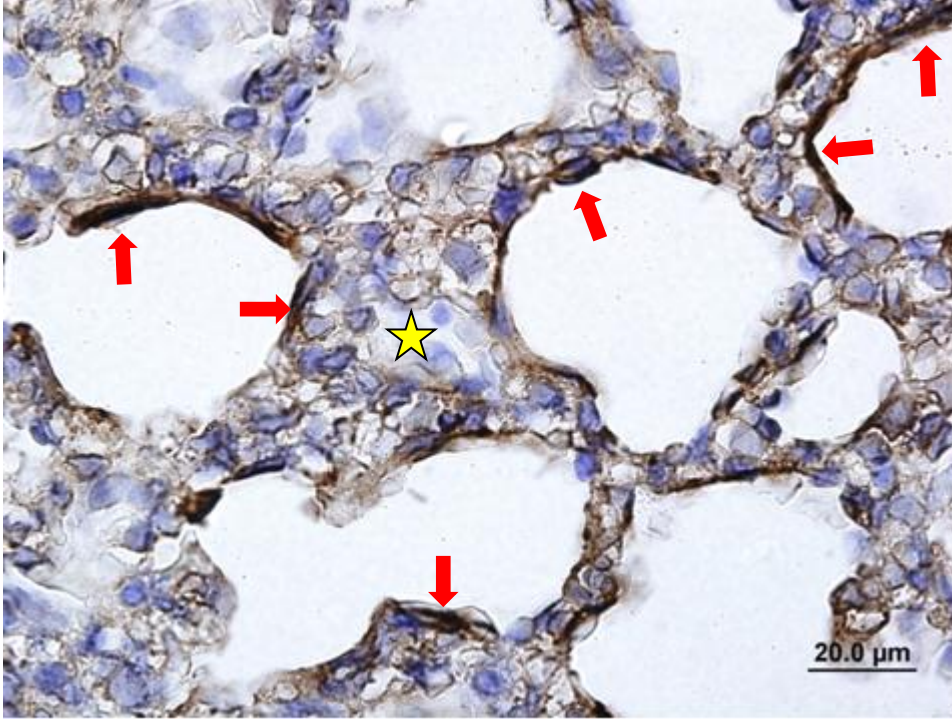
Resim 10: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, alveolar hasar ve alveoler fibrozisde azalma, Azan Trichrom x100



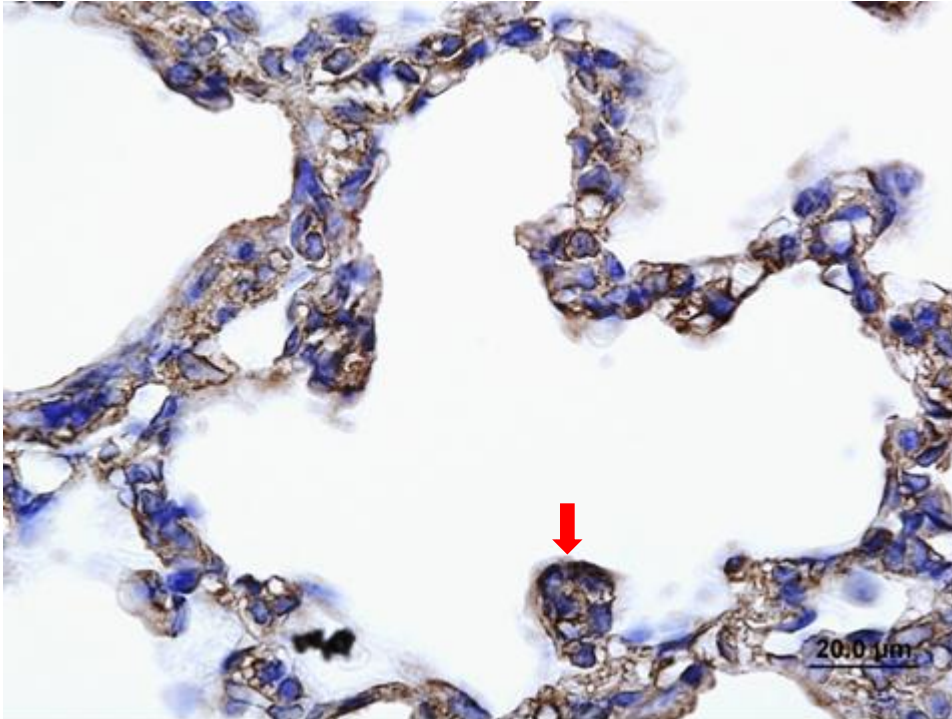
Resim 11: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu, α -SMA immunreaktivitesi x100



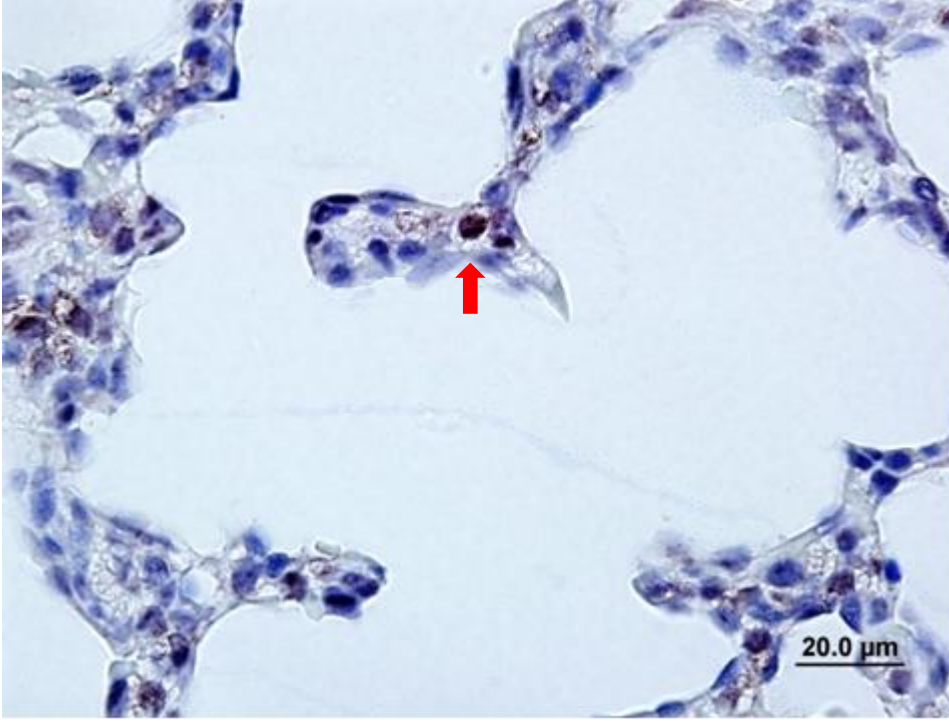
Resim 12: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, α -SMA immunreaktivitesi x100



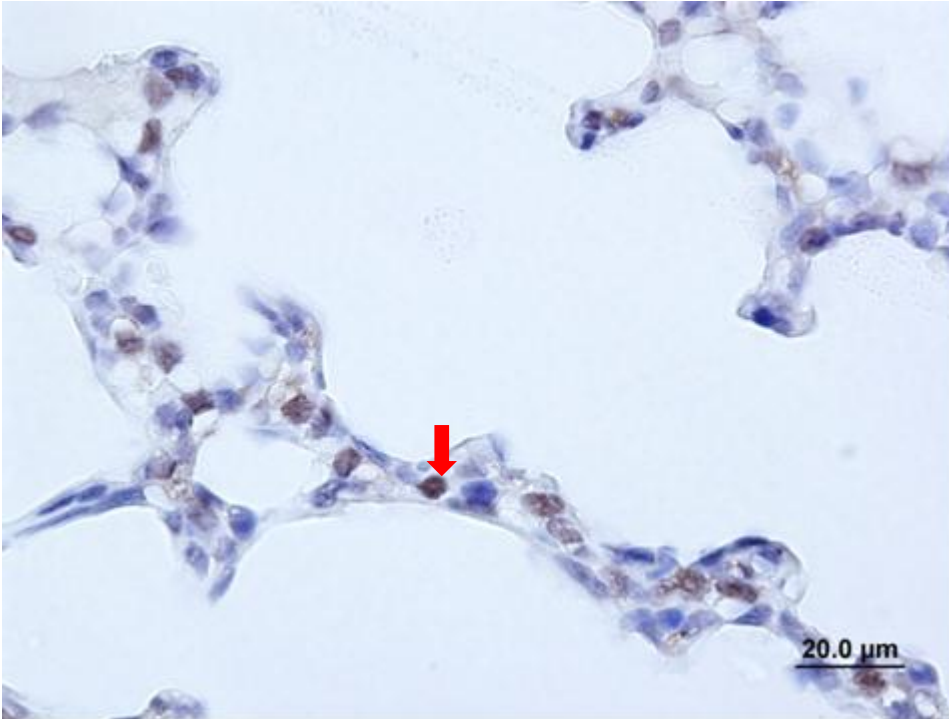
Resim 13: LPS grubuna ait akciğer dokusu, alveol duvarında kalınlaşma (★) ve α -düz kas aktin immunreaktivitesinde artma (→) α -SMA x100



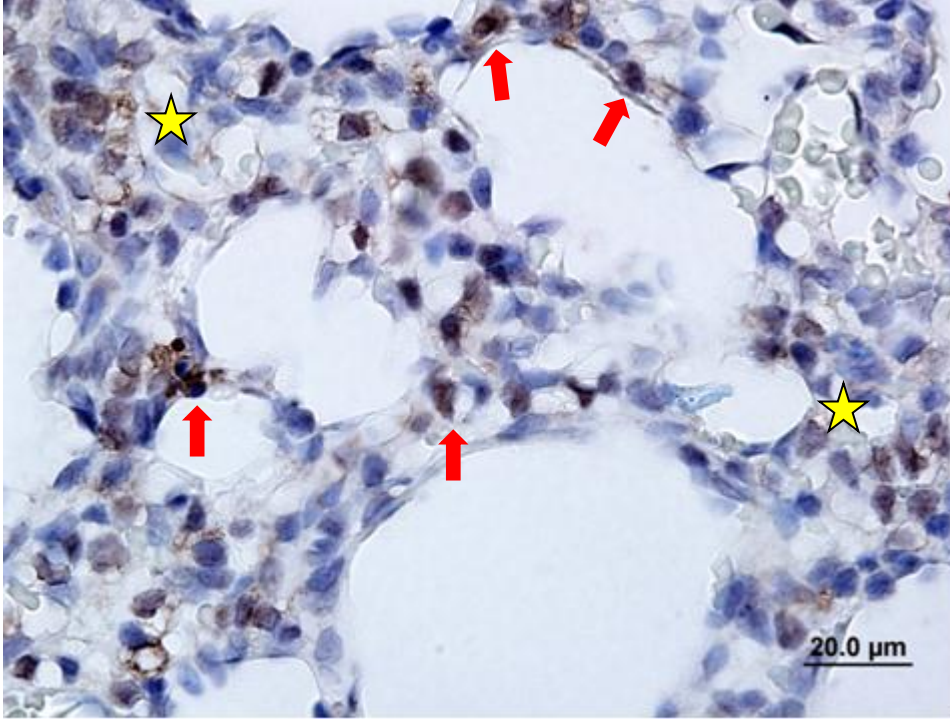
Resim 14: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, α -düz kas aktin immunreaktivitesindeki artışta azalma (→), α -SMA x100



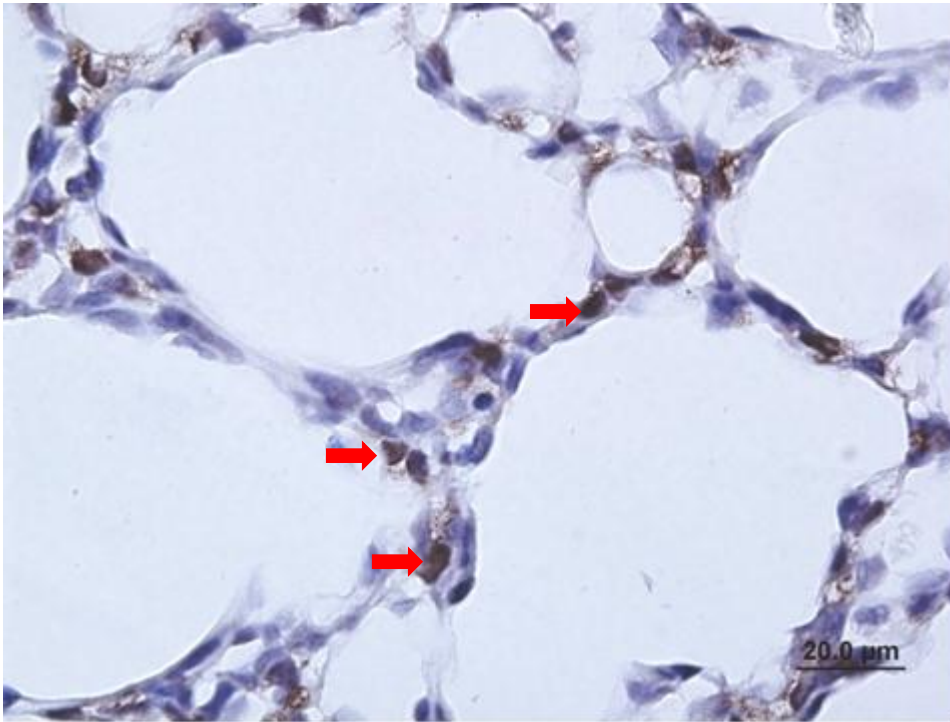
Resim 15: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu, Aktive Kaspaz-3 immunreaktivitesi (→) x100



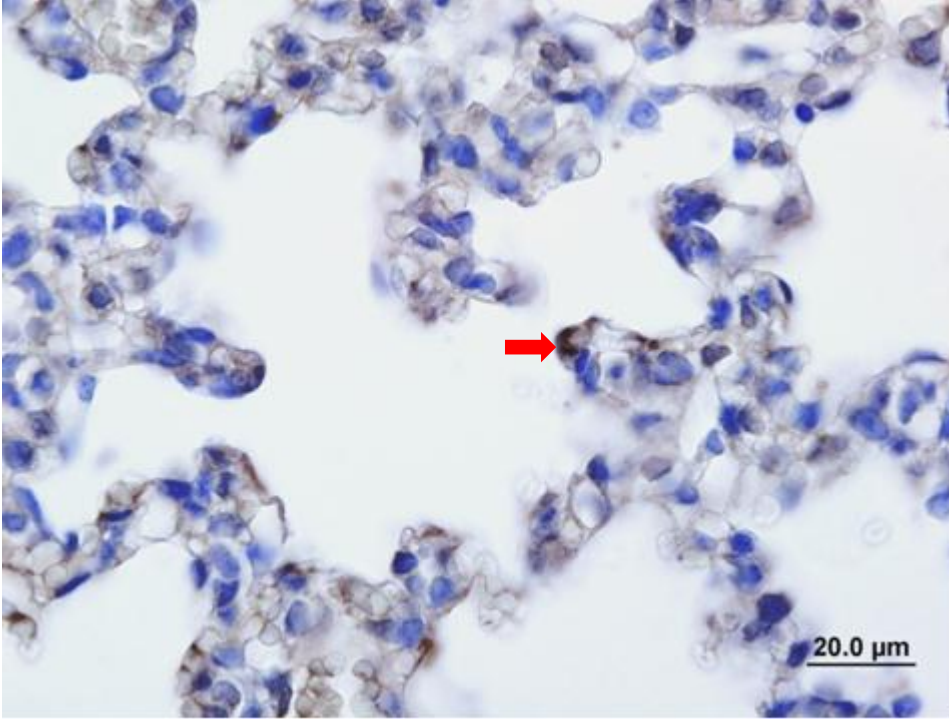
Resim 16: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi (→) x100



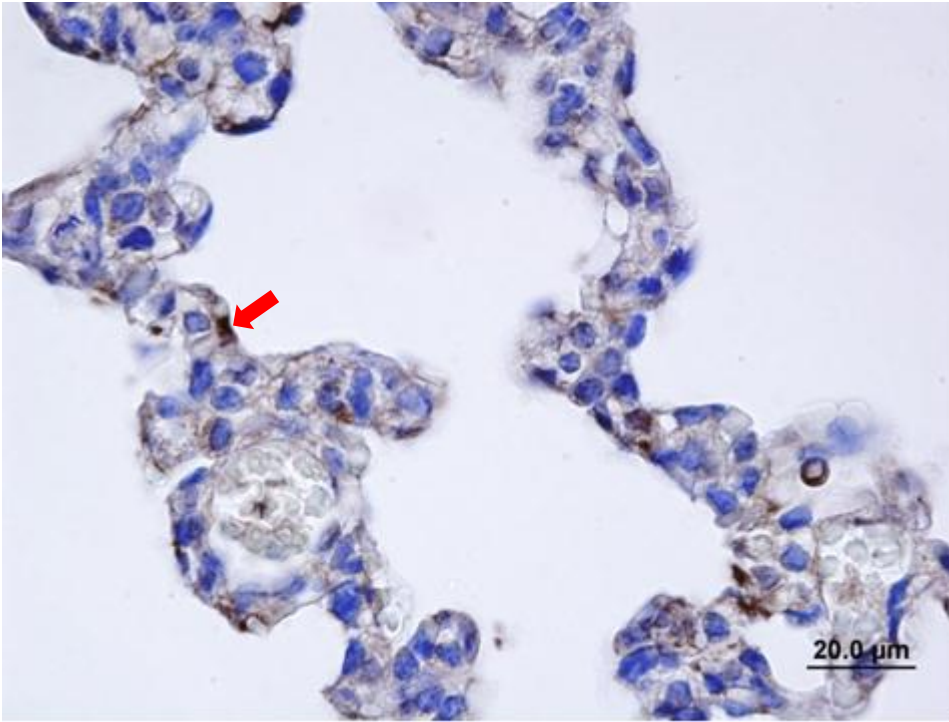
Resim 17: LPS grubuna ait akciğer dokusu, alveol duvarında kalınlaşma (★) ve aktive kaspaz-3 immunreaktivitesinde artma (→), Aktive Kaspaz-3 x100



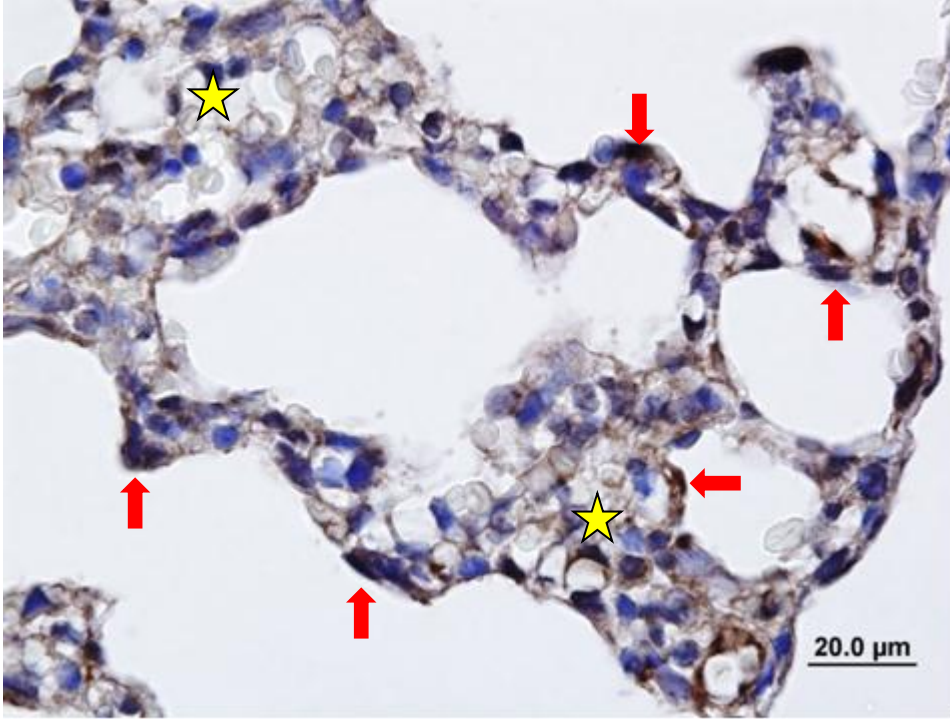
Resim 18: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, artmış aktive kaspaz-3 immunreaktivitesinde azalma (→), Aktive Kaspaz-3 x100



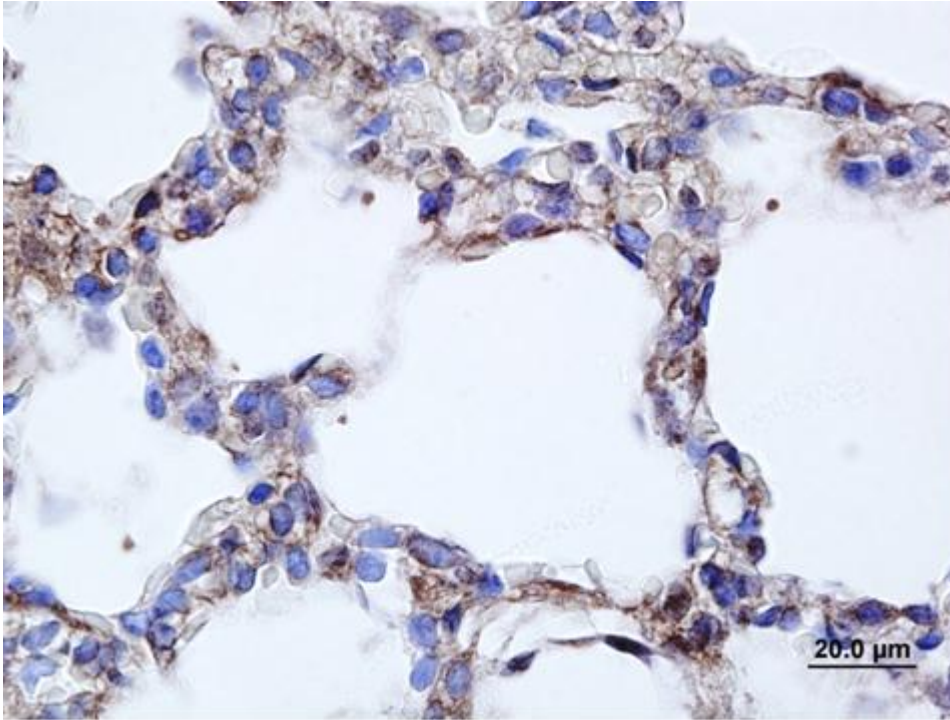
Resim 19: Kontrol grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu, M30 immunreaktivitesi x100



Resim 20: Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, M30 immunreaktivitesi x100



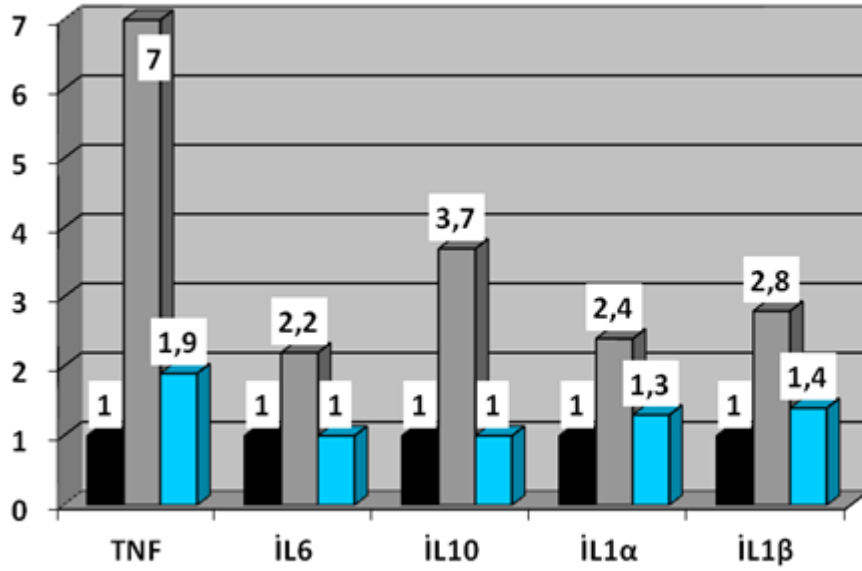
Resim 21: LPS grubuna ait akciğer dokusu, alveol duvarında kalınlaşma (★) ve M30 immunreaktivitesinde artma (→) x100



Resim 22: LPS+Hipotermi grubuna ait akciğer dokusu, artmış M30 immunreaktivitesinde azalma x100

4.5. Sitokin gen ekspresyonu:

Real time PCR ile proinflamatuvar sitokinlerden TNF, İL6, İL1 α ve İL1 β , antiinflamatuvar sitokinlerden İL10 gen ekspresyonları çalışıldı. Gruplar arası gen ekspresyonu düzeylerinde 2 kat ve üzeri artışın olması anlamlı olarak kabul edildi (80). TNF düzeylerine bakıldığında LPS grubunda kontrol grubuna göre 7 kat artmış gen ekspresyonu saptanmasına karşın, Hipotermi+LPS grubunda yalnızca LPS grubuna göre TNF gen ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. Diğer proinflamatuvar stokinler olan İL6, İL1 α ve İL1 β gen ekspresyonlarında da LPS grubunda belirgin bir artış izlendi, Hipotermi+LPS grubunda ise gen ekspresyonlarında azalma saptandı.



Tablo 9 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

| Gen ekspresyonu olan stokinler | Grup | | | |
|--------------------------------|---------|------------------|---------------|-----------|
| | Kontrol | Lipopolisakkarit | Hipotermi+LPS | Hipotermi |
| TNF | 1 | 7 | 1,9 | 1,7 |
| İL6 | 1 | 2,2 | 1 | 1 |
| İL10 | 1 | 3,7 | 1 | 1 |
| İL1a | 1 | 2,4 | 1,3 | 1,2 |
| İL1b | 1 | 2,8 | 1,4 | 1,2 |

6.TARTIŞMA

Bronkopulmoner displazi, prematüre bebeklerin kronik akciğer hastalığıdır. Günümüzde, antenatal kortikosteroidlerin yaygın kullanımı, postnatal sürfaktan ve daha az agresif mekanik ventilasyon gibi iyileştirilmiş neonatal yoğun bakım uygulamaları sonucunda, akciğer gelişimini tamamlamamış çok düşük doğum ağırlıklı prematürelerin hayatta kalma oranı artmaktadır (3). Henüz, özellikle yeni BPD için etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamakta ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir.

Bronkopulmoner displazinin gelişim mekanizmalarını anlayabilmek için pek çok hayvan modeli geliştirilmiştir. Hiperoksinin neden olduğu alveologenezis duraklamasında rol oynayan hücrel ve moleküler değişiklikler yirmi yıldan daha fazla süredir araştırılmaktadır. Alveolarizasyonun postnatal 4 ile 20. günler arasında tamamlandığı (81), hiperoksiye cevap olarak hücre içi reaktif oksijen türevlerinin arttığı, proteinaz/antiproteinaz dengesinin bozulduğu, inflamasyon ve stres cevabını ortaya çıktığı, hücre büyüme ve farklılaşma düzeninin bozulduğu görülmüştür (23). Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile uyumlu olarak akciğer endotel ve epitel hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir (82). Yeni BPD'nin gelişiminde merkezde yatan faktör inflamasyondur. BPD gelişiminde rol alan birçok proinflamatuvar ve kemotaktik faktörler ventile edilen preterm infantın akciğer dokusunda yüksek miktarda saptanmıştır. Makrofaj inflamatuvar protein 1 ve İL8 sekresyonu devam ederken, karşı düzenleyici olan İL 10 düzeyleri azalır. Sonuç olarak düzensiz, inatçı inflamasyon oluşur. İntertisyel alana göç eden inflamatuvar hücrelerden inflamatuvar mediatörler salınır, serbest oksijen radikalleri oluşur, TGFβ üretimi artar (83).

Erken dönemde koryoamniyoniti olan bebeklerde RDS riski artmıştır. Ciddi koryoamniyonitli bebeklerde sürfaktan tedavisine klinik cevap azalmış ve uzun süre mekanik ventilatör tedavisi ihtiyacı artmıştır ve bu hastalarda BPD sıklığı daha fazladır (84). Koryoamniyonitli bebeklerde alveolizasyonu inhibe eden TNFα, İL6 ve İL11 ekspresyonu, lökosit sayısı ve proinflamatuvar sitokinler artar (İL6, İL1β, TNFα) ve nekroz oluşur. Uzamış bu proinflamatuvar ortamda anormal alveolar septasyonlar oluşur ve yeni BPD bulguları ortaya çıkar (85).

Hemorajik şok sonrası gelişen microvasküler hasarlanmada rol alan oksijen radikalleri lökosit aktivasyonuna ve microvasküler endotel hasarına neden olur. Hasarlanmış endotelin permeabilitesi bozulur, damar dışına kaçışa ve ödeme neden olur. Hipotermik durumun

oksidatif stresi azaltarak bu hasarlanmayı önlediği saptanmıştır (86). Sıçanlarda yapılan endotoksinle oluşturulmuş akut akciğer hasarında (ALİ) anahtar rol oynayan hücreler olan lökositlerden inflamatuvar sitokinler salınır, reaktif oksijen radikalleri oluşur, sonuç olarak akciğerde ödeme ve hasara neden olur. ALİ de uygulanan hipotermi tedavisi ile nötrofil infiltrasyonunun, oksijen radikal seviyelerinin ve akciğer ödeminin azaldığı gösterilmiştir (87)

Teröpatik hipotermi vazojenik ödem ve hemorajiyi azaltan, nötrofil infiltrasyonunu engelleyen, eksitatör nörotransmitter salınımını azaltan, intraselüler kalsiyum birikimini sınırlayan, serbest oksijen radikali üretimini engelleyen, sitokin ekspresyonunu ve apoptozisi azaltan özellikleri olan tedavi şeklidir (88). Daha önce yapılmış deneysel çalışmalarda akut serebrovasküler olayda, akut spinal hasarda, hipoksik iskemik ensefalopatide doku hasarlanmasını azaltıcı etkinliği gösterilmiştir. Mevcut etki mekanizmaları nedeniyle hipoksik iskemik ensefalopati vakalarında klinik kullanıma girmiştir.

Deneysel çalışmalarda hipotermi tedavisinin sitoprotektif, antiinflamatuvar, antiapoptotik etkinlik gösterdiği ve reaktif oksijen oluşumunu, sitokin salınımını azalttığı, metabolizmayı yavaşlattığı gösterilmiştir (88). Bu çalışmada, gelişim evresi insanlardaki geç sakküler ve erken alveolar dönemle uyumlu olan immatür akciğerlere sahip yenidoğan sıçanlarda BPD gelişiminde önemli risk faktörlerinden biri olan antenatal enflamasyona bağlı akciğer hasarı oluşturulmuştur. Hipotermi tedavisinin alveolar alan, fibrozis, düz kas hiperplazisi ve sitokin ekspresyonları üzerine olan etkinliği araştırılmış, hipotermimin BPD’de pek çok patofizyolojik süreci etkileyebilecek bir tedavi şekli olduğu görülmüştür.

Bu çalışma yenidoğanın akciğer hasarında hipotermi tedavisinin etkinliğinin gösterildiği ilk çalışmadır. Hipotermi tedavisinin farklı hasarlandırıcı mekanizmalarla olan enflamatuvar yanıtı baskılayarak, nöroprotektif etkinlik gösterdiği deneysel ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Benzer şekilde çalışma sonuçlarımız hipotermi, enflamatuvar sitokin ekspresyonunu azaltarak alveolar hasarlanmayı önlemek yoluyla BPD’de de koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. Hipotezimizi destekler şekilde hipotermimin LPS ile oluşturulan BPD modelinde TNF gen ekspresyonunu 3,5 kat, İL6, İL1 α ve İL1 β ekspresyonunu 2 kat azalttığı saptandı.

Hipotermimin nöroprotektif etkinliği kanıtlanmış olsa da, özellikle ağır hipotermimin koagulopatiji, sepsisi, elektrolit bozukluklarını, aritmileri, miyokard disfonksiyonunu, hipovolemiyi, kan hiperviskozitesini, trombosit fonksiyon bozukluğunu, pankreatit gelişimini arttırdığı bilinmektedir (89). Her ne kadar teröpatik hipotermi orta-ağır hipoksik iskemik term

yenidoğanlarda klinik uygulamaya girse de preterm bebeklerde hipoterminin yan etkilerinden ve bu konuyla ilgili çalışma yetersizliğinden dolayı kullanılmamaktadır. BPD'nin de temel olarak preterm bebeklerin sorunu olması nedeniyle çalışmamızda hipotermiye bağlı morbiditeleri de göz önünde bulundurarak hafif hipotermi seçilmiştir. Hipoterminin nöroprotektif etkinliğini değerlendirilen deneysel çalışmalarda 24-72 saat süreyle hipotermi uygulanmıştır. Bu çalışmalarda koruyucu etki açısından 24 saat süre üzerindeki hipoterminin koruyucu etkinliği arttırmadığı ancak mortalite ve morbiditeyi arttırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda hipotermi süresi olarak 24 saat seçilmiştir (90).

Sonuç olarak, BPD gelişimi çok yönü olup mekanik ventilasyon, oksijen toksisitesi, prematurite, infeksiyon ve inflamasyon gibi faktörler başlıca rol oynamaktadır. Günümüzde BPD gelişimini engelleyici tek başına bir tedavi bulunmamaktadır. Hipotermi tedavisinin, yenidoğan sıçanlarda gerçekleştirdiğimiz BPD modelinde etkin olduğu saptanmıştır. Hipoterminin BPD patofizyolojisindeki diğer basamaklara da etkinliğinin gösterilmesi, uygun hasta seçimi, optimal ısı, sürenin belirlenmesi ve hipoterminin hedef popülasyonda güvenilirliğini destekleyen çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışma sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi durumunda hipotermi BPD tedavisinde yeni bir seçenek olarak kullanılabilir.

6. SONUCLAR

1. Antenatal inflamasyonla ilişkili akciğer hasarında alveoler yüzey alanının azaldığı, fibrotik değişikliklerin meydana geldiği, düz kas içeriğinin arttığı ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun arttığı görüldü.
2. Hipotermi tedavisinin, alveolar yüzey alanını arttırdığı, fibrozisi, düz kas içeriği ve proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonu düzeylerini azalttığı saptandı.
3. Hipotermi tedavisinin antiapoptotik ve antinflamatuvar özellikleri nedeniyle bronkopulmoner displazinin önlenmesinde de etkili olabileceği ilk kez bu çalışma ile ortaya kondu.

7. KAYNAKLAR

1. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006; 367: 1421-1431.
2. D'Angio CT, Maniscalco WM. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Paediatr Drugs* 2004; 6: 303-330.
3. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics* 2001; 107: 1-8.
4. Northway WH. Bronchopulmonary Dysplasia: Thirty-Three Years Later, *Pediatric Pulmonology* 2001; 25: 235-7.
5. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723-1729.
6. Bland RD. Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biology of the Neonate* 2005; 88: 181-191.
7. Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology* 2003; 8: 63-71.
8. Duman N, Kumral A, Gülcan H, Özkan H. Outcome of very-low-birth-weight infants in a developing country: A prospective study from the west region of Turkey, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2003; 13: 54-8.
9. Gülcan H, Üzüm İ, Aslan S, Yoloğlu S. İnönü Üniversitesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen çok düşük doğum ağırlıklı preterm olgularımızın değerlendirilmesi, *İNönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 11: 19-23.
10. Atasay B., Günlemez A., Ünal S., Arsan S., Outcomes of very low birth weight infants in a newborn tertiary center in Turkey, 1997-2000. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2003; 45: 283-289.
11. Koksall N, Bayram Y, Baytan B. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde mekanik ventilasyon tedavisi gören yenidoğanların retrospektif değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 28: 1-4.
12. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia, *Seminars in Neonatology* 2003; 8: 73-81.

13. Groenman F, Ungre S, Post M. The molecular basis for abnormal human lung development. *Biology of the Neonate* 2005; 87: 164-177.
14. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia, *Seminars in Perinatology* 2006; 30: 179-184.
15. Bancalari E, Claure N. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30: 164-170
16. Esmon CT. Protein C Pathway. *Chest* 2003;124: 26-32
17. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biology of the Neonate* 2001; 79: 205-9.
18. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 1995; 73: 1-3.
19. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology* 1995; 19: 371-378.
20. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2006; 91: 132-5.
21. Chess PR, D'angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 2006; 30: 171-178.
22. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002; 181: 60-7.
23. Atar MA, Donn SM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. *Seminars in Neonatology* 2002; 7: 353-360.
24. Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme, *Pediatric Research* 2006; 59: 185-190.
25. Sweet DG, Halliday HL, Warner JA. Airway remodelling in chronic lung disease of prematurity. *Paediatric Respiratory Reviews* 2002; 3: 140-6.
26. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Seminars in Neonatology* 2003; 8: 18-27.
27. Kazzi SN, Quasney MW. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme is associated with increased risk and severity of bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Pediatrics* 2005; 147: 818-22.
28. Rojas MA, Gonzales A, Bancalari E, Claure N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *Journal of Pediatrics* 1995; 126: 605-610.

29. Hislop AA. Bronchopulmonary dysplasia: prenatal and postnatal influences. *Pediatric Pulmonology* 2001; 23: 107-109.
30. Rossi UG, Owens CM. The radiology of chronic lung disease, *Archives of Disease in Childhood* 2005; 90: 601-7.
31. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW Moderately early (7-14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 1. Art. No: CD001144.
32. Pantalitschka T, Poets CF. Inhaled drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41: 703–8.
33. Van Marter LJ. Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. *Current Opinion in Pediatrics* 2005; 17: 174-180.
34. Ozer EA, Kumral A, Ozer E, Duman N, Yilmaz O, Ozkal S, Ozkan H. Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung in the newborn rat. *Pediatric Pulmonology* 2005; 39: 35-40.
35. Christou H, Brodsky D. Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *Journal of Intensive Care Medicine* 2005; 20: 76-87.
36. Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Morgan D, Montgomery G, Grover TR, Abman SH. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005; 289: 529–535.
37. Van Haaften T, Thebaud B. Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: Hing-Yu So Therapeutic hypothermia *Korean J Anesthesiol* 2010; 59(5): 299-304
38. Kees H, Polderman MD. Mechanisms of action, physiological effects and complications of hypothermia 2009; 37: 186–202.
39. Benviste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer N.H, Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem* 1984;43:1369-1374
40. Okuda C, Saito A, Miyazaki M, Kuriyama K, Alteration of the turnover of dopamine and 5 hydroksitryptamine in rat brain associated with hypothermia. *Pharmacol. Biochem Behav.* 1986;25:79-83.
41. Leker RR, Shohami E, Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res.Rev.*2002;39:55-73.

42. Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kkaia M, Persson H, Lindvall O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 1993;90:6711-6715.
43. D'Cruz BJ, Ferting KC, Filiano AJ, Hicks SD, DeFranco DB, Gallaway CW. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 2002;22:843-851.
44. Matson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 2000;301:173-187
45. Bargonetti J, Manfredi JJ, Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.* 2002;14:86-91.
46. Reed J. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 1998;17:3225-3236.
47. Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Daval JL. Effects of hypothermia on hypoxia-induced apoptosis in cultured neurons from developing rat forebrain: comparison with preconditioning. *Pediatr. Res.*2000;47:385-391.
48. Khar A, Pardhasaradhi BV, Ali AM, Kumari AL. Protection conferred by Bcl-2 expression involves reduced oxidative stress and increased glutathione production during hypothermia-induced apoptosis in AK-5 tumor cells. *Free Radic. Biol. Med.*2003;35:949-957.
49. Morganti-Kosmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, Stocker R. Trentz O, Kossmann T. Production of cytokines following brain injury : beneficial and deleterious for damaged tissue. *Mol. Psychiatry.*1997;2:133-136.
50. Liu L, Kim JY, Kroike MA, Yoon YJ, Tang XN, Ma H, Lee H, Steinberg GK, Lee JE, Yenari MA. FasL shedding is reduced by hypothermia in experimental stroke. *J. Neurochem.*2008;106:541-550.
51. Kuida K. Caspase-9. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*2000;32:121-124.
52. Zhao H, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Mild postischemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke.* 2004;35:572-577.
53. Lopez-Hernandez FJ, Ortiz MA, Piedrafita FJ. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage. *Apoptosis.* 2006;11:1339-1347.
54. Schmitt KR, Diestel A, Lehnardt S, Schwartlander R, Lange PE, Berger E, Ullrich O, Abdul-Khaliq H. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling
55. Kimura T, Sako K, Tanaka K. Effect of mild hypothermia on energy state recovery following transient forebrain ischemia in the gerbil. *Exp. Brain Res.*2002;145:83-90.

56. Hegardal M, Harp J, Nilsson L, Siesjo BK. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *J.Neurochem.*1975;24:311-316.
57. Varon J, Acosta P,. Therapeutic hyothermia: past, presnt and future. *Chest* 2008;133:1267-1274.
58. Bernard SA, Jones BMC, Horne MK. Clinical trial of induced hypothermia in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Ann. Emerg. Med.*1997;30:146-153.
59. Dogne JM, Hanson J, de Lavel X, Masereel B, Kolh P, Priotte B. New developments on thromboxane modulators. *Mini Rec. Med. Chem.*2004;4:649-657.
60. Aibiki M, Maekawa S, Yokono S. Moderate hypothermia improves imbalances of thromboxane A2 and prostoglandin I2 production after traumatic brain injury in humans. *Crit. Care Med.* 2000 ;28:3902-3906.
61. Biggar WD, Bohn DJ, Kent G. Neutrophil migration in vitro and in vivo during hypothermia. *Ïnfect. Ïmmun.* 1984;46:857-859
62. Wenisch C, Narzt E, Sessler DÏ. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leucocytes. *Anesth Anolg.*1996;82:810-816.
63. Deng H, Han HS, Cheng D. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke.* 2003;34:2495-2501.
64. Wang GJ, Deng HY, Maier CM. Mild hypothermia reduces ÏCAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience.* 2002;114:1081-1090.
65. Berlin B, Shavit Y, razumovsky J. Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology.* 1998;89:1133-1140.
66. Quing M, Nimmesgern A, Heinrich PC. Ïntrahepatic synthesis of tumor necrosis factor-alpha related to cardiac surgery is inhibited by interleukin-10 via the janus kinase(jak)/signal transducers and activator of transcription (STAT) pathway. *Crit. Care Med.* 2003;31:2769-2775.
67. Kentner R, Rollwagen FM, Prueckner S. Effects of mild hypothermia on survival and serum cytokines in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Shock.* 2002;17:521-526.
68. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implicateions for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. NNatl. Acad.Sci USA;*87:1620-1624.
69. Adelson P.D. Hypothermia following pediatric traumatic brain injury. *J.of Neurotruma;*26:429-436.

70. Marion D, Bullock MR. Current and future role of therapeutic hypothermia. *J. Of Neurotrau.* 2009;26:455-467
71. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD 003311.
72. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR, Jr, Muizelaar JP, Wagner FC, Jr, Marion DW, Luerssen TG, Chesnut RM, Schwartz M. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N.Eng. J. Med.* 2001;344:556-563.
73. Shiozaki T, Hayakata T, Taneda M, Nikajima Y, Hashiguchi N, Fujimi S, Nakamori Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. A multicenter prospective randomized controlled trial of the efficacy of mild hypothermia for severely head injured patients with low intracranial pressure. *J Neurosurg.* 2001;94:50-54.
74. Clemmensen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* .1999;29:648-653.
75. Rose C, Michalak A, Rambaldi A, Chatauret N, Pannunzio M, Butterworth RF. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology.* 2000;31:872-877.
76. Rose C, Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: Decreased uptake or increase released? *Metab. Brain dis.* 2002;17:251-261.
77. Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci. Lett.* 1997;229:201-203.
78. Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: A ¹H/¹³C-nuclear magnetic resonance study . *Gastroenterology.* 2003;125:815-824.
79. Cao L, Wang J, Tseu I, Luo D, Post M. Maternal exposure to endotoxin delays alveolarization during postnatal rat lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:726-737
80. Jull SE, Beyer RP, Bammler TK, McPherson RJ, Wilkerson J, Farin FM. Microarray analysis of high-dose recombinant erythropoietin treatment of unilateral brain injury in neonatal Mouse hippocampus. *Pediatr. Res.* 2009;65: 485-492.
81. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 1010: 405-416.

82. Sue RD, Belperio JA, Burdick MD, Murray LA, Xue YY, Dy MC, et al. CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 3860–3868.
83. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch. Dis Child.*1995;73:F1-F3.
84. Been JV, Rours IG, Kornelisse RF. Chorioamnionitis alters the response to surfactant in preterm infants. *J Pediatr.* 2010;156:10.e11-15.e11.
85. Rose M, Viscardi MD. Üreplasma species: Role in diseases of prematurity.*Clin Perinatol.*2010;37:393-409.
86. Childs EW, Udobi KF, Hunter FA. Hypothermia reduces microvascular permeability and reactive oxygen species expression after hemorrhagic shock. *J. Trauma.* 2005;58: 271-277.
87. Chin JY, Koh Y, Kim MJ, Kim HS, Kim WS, Kim DS. The effect of hypothermia on endotoxin-primed lung. *Anesth. Analg.* 2007;04: 1171-1178.
88. Kumral A, Yeşilirmak D, Tüzün F, Duman N, Özkan H. İnduced hypothermia as a new approach to brnchopulmonary dysplasia. *Med. Hypotheses.* 2008;71: 617-618.
89. Kees H, Polderman . Mechanisms of action, physiological effects and comlications of hypothermia. *Crit. Care Med.* 2009;37: 186-202.
90. Lee BS, Woo C, Kim S, Kim K. Long-Term neuroprotective effect of postischemic hypothermia in a neonatal rat model of severe hypoxic ischemic encephalopathy: A comparative study on the duration and depth of hypothermia. *Ped.Res.* 2010;68:303-308.
91. Ueda K, Cho K, Matsuda T, Okajima S, Uchida M, Kobayashi, Minakami H, Kobayashi K. A rat model for arrest alveolarization induced by antenatal endotoxin administration *pediatr res.* 2006;59:396-400
92. Yesilirmak DC, Kumral A, Baskın H, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain.*Brain Res.* 2007;1164:14-23
93. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced White Matter Injury in the Neonatal Rat Brain. *Neonatology* 2007;92:269-278
94. Choi CW, Kim BÍ, Hong J, Kim E, Kim H, Choi J. Bronchopulmonary dysplasia in a rat model induced by intra-amniotic inflammation and postnatal hyperoxia: Morphometric aspects. *Ped. Res.*2009;65:323-327.

EK 1

İZMİR İLİ HALI ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK İZMİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

02/2018 Protokol No'lu, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Nazım DEMİR'in yönetiminde olduğu "Bronkopulmoner displazi modelinde bağışıklık
sistem etkinliğinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik kurulun rolüne ilişkin

Bilgilerinize ve görüşünü arz ederim.

Prof.Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı
(Araştırma)

Prof.Dr. A. Necati GÖKMEZ
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr. Alper SOYLU
Üye (top. katılmadı)

Prof.Dr. Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr. Selman SÖKMEZ
Üye

Prof.Dr. Ö. Nejat SARHOŞMANOĞLU
Üye
(top. katılmadı)

Doç.Dr. Tuna İLKNUR
Üye
(top. katılmadı)

Doç.Dr. Halil İbrahim BALCIYANIK
Üye

Doç.Dr. Abdullah KUMRAL
Üye (Araştırma)

Doç.Dr. A. Hilmiye BASKIN
Üye
(top. katılmadı)

Doç.Dr. Tuncay İNCEBOZ
Üye

Viz. Hekim Şebek SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALIN
Üye (top. Katılmadı)

Doç.Dr. Sermin GENÇ
Üye

Etik Kurulunun görüşleri aşağıda belirtilen şekilde kullanılarak rapora yerleştirilmelidir.