



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
NEONATOLOJİ BİLİMDALI**

**DENEYSEL HİPEROKSİ ARACILI AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN
YENİDOĞAN SIÇANLARDA TRAKEAL YOLLA VERİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Dr. Selvi GÜLAŞI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**Danışman
Prof. Dr. Aytuğ ATICI**

MERSİN - 2012

TEŞEKKÜR

Neonatoloji Yandal Uzmanlık eğitimim sürecinde yetişmeme ve neonatoloji eğitimime katkıda bulunan, tezimi hazırlarken her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Aytuğ ATICI'ya, katkılarından dolayı Doç. Dr. Necat YILMAZ, Prof. Dr. Ayşe POLAT, Dr. Mustafa YILMAZ, Biyolog Melisa LAÇIN ve Yrd. Doç. Dr. Gülhan ÖREKİCİ'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları boyunca gösterdikleri çaba ve destek için Vet. Dr. Tamer YENER'e, Teknisyen Mehmet ACIOĞLU'na ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Başta Prof. Dr. Mehmet SATAR olmak üzere eğitimim sürecinde katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında manevi destekleri ile yanımda olan Mersin Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları'nda birlikte çalışmış olduğum uzman, asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzm. Hem. Neşe KELEŞ adına yapılan maddi yardımlar nedeniyle teşekkür ediyor, anısının önünde saygıyla eğiliyorum.

Eğitimim süresince her zaman yanımda olan aileme ve sabırla hep yolumu gözleyen eşim Serdal'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
KISALTMA LİSTESİ.....	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3. Patofizyoloji.....	5
2.3.1. Normal Akciğer Gelişimi.....	5
2.3.2. Akciğerlerde Damarsal Gelişim.....	6
2.3.3. Bronkopulmoner Displazide Akciğer Gelişiminde Duraklama	7
2.3.4. Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patofizyolojisi	9
2.4. Bronkopulmoner Displazinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	10
2.4.1. Erken Doğum	11
2.4.2. Mekanik Ventilasyon	11
2.4.3. Oksijen Toksisitesi	12
2.4.4. Enfeksiyonlar	14
2.4.5. Yangı	14
2.4.6. Genetik.....	15
2.4.7. Geç Sürfaktan Eksikliği.....	16
2.5. Klinik Bulgular	16
2.6. Radyolojik Bulgular.....	17
2.7. Klinik Seyir ve Prognoz.....	18
2.8. Bronkopulmoner Displazinin Önlenmesi ve Tedavisi	19
2.8.1. Doğum Öncesi Tedaviler: Doğum Öncesi Steroid Kullanımı	19
2.8.2. Zamanından Önce Doğumun Erken Sorunlarının ve Hastalıklarının Önlenmesi	19
2.8.2.1. Sürfaktan Tedavisi	19
2.8.2.2. Patent Duktus Arteriyozusunun Kapatılması.....	20
2.8.2.3. Prematüre Apnesinde Kafein Kullanımı	20
2.8.3. Anti-inflamatuvar Tedaviler.....	21
2.8.3.1. Sistemik Kortikosteroidler: Dekzametazon ve Hidrokortizon.....	21
2.8.3.2. İnhale Kortikosteroidler	22
2.8.3.3. İnhale Nitrik Oksit	22
2.8.4. Serbest Oksijen Kökleri ve Antioksidanlar.....	23
2.8.4.1. Serbest Oksijen Kökleri	23
2.8.5. Beslenme.....	23
2.8.5.1. A Vitamini	24
2.8.6. Sıvı Kısıtlaması ve Diüretik Tedavi	24
2.8.7. Bronkopulmoner Displaziyi Önlemede Koruyucu Ventilatör Yöntemleri ...	24
2.8.7.1. İzin Verilebilir Karbondioksit Yüksekliği Uygulanması	24

2.8.7.2. Yüksek Frekanslı Ventilasyon.....	24
2.8.7.3. Nazal Devamlı Pozitif Havayolu Basıncı	25
2.8.7.4. Hedef Satürasyon Belirleme	25
2.8.8. Diğer Tedaviler	25
2.8.8.1. H ₂ Resptör Blokerleri: Simetidin.....	25
2.8.8.2. Üreoplazma Enfeksiyonlarının Makrolidlerle Tedavisi.....	26
2.8.8.3. Yoğun Fototerapi.....	26
2.9. Bronkopulmoner Displazi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Deneysel Akciğer Hasar Modelleri	26
2.10. Güncel ve Gelecek Tedaviler	28
2.10.1. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücre Tanımı	29
2.10.2. Tedavisinde Kök Hücre Kullanılan Hastalıklar	31
2.10.3. Bronkopulmoner Displazide Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Gelecekteki Yeri.....	32
2.10.4. Bronkopulmoner Displazi Tedavisinde Kök Hücrelerin Olası Etki Mekanizmaları	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
3.1. Çalışma Ekibi.....	34
3.2. Etik Kurul Onayı.....	34
3.3. Gereçler.....	34
3.4. Deney Hayvanları	34
3.5. Çalışma Grupları.....	34
3.6. Hiperoksik Akciğer Hasarının Oluşturulması.....	36
3.7. Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Mezenkimal Kök Hücre Üretimi	37
3.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücre Kültürü Ortamından Kaldırılması	38
3.9. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transfeksiyon Yöntemiyle İşaretlenmesi.....	39
3.10. Floresan İşaretli Hücrelerin Sıçanlara Verilecek Duruma Getirilmesi	40
3.11. Trakeal Yolla Serum Fizyolojik, Medyum, Vasat ve Mezenkimal Kök Hücre Verilmesi ve Akciğerlerin Çıkarılması.....	40
3.12. Trakeal Yoldan Verilen Kök Hücrelerin Akciğer Dokusuna Yerleşiminin Gösterilmesi	41
3.13. Akciğer Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi	42
3.13.1. Morfolojik Analiz ve Akciğer Hasarının Skorlanması	42
3.13.2. Myofibroblastların α -SMA Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Yöntemle Tespiti.....	44
3.14. İstatistiksel Yöntemler	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	46
4.2. Akciğer Ağırlıklarının Karşılaştırılması.....	47
4.3. Alveol Sayısı ve Alveol Çapı Değişikliklerinin Karşılaştırılması	47
4.4. Ödem, Fibrozis, Konjesyon ve Lökosit İnfiltrasyonunun Karşılaştırılması	48
4.5. Myofibroblastların α -SMA Ekspresyonuna Göre Fibrozisin Karşılaştırılması ...	49
4.6. Grupların Değerlendirilen Akciğer Dokularının Makroskopik Özellikleri	50
4.7. Grupların Değerlendirilen Akciğer Dokularının Patolojik Özelliklerinin Fotoğrafları	50
4.8. Mezenkimal Kök Hücre Yerleşiminin Gösterilmesi	52
5. TARTIŞMA.....	56

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZGEÇMİŞ	79

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bronkopulmoner displazinin tanı ölçütleri	4
Tablo 2. Doğum ağırlığına göre bronkopulmoner displazi sıklığı.....	4
Tablo 3. Eski ve yeni bronkopulmoner displazi patolojisindeki farklar	9
Tablo 4. Bronkopulmoner displazide uzun ve kısa dönem sonuçlar.....	18
Tablo 5. Hiperoksi aracılı akciğer hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan skrolama sistemi.....	43
Tablo 6. Grupların 10. ve 57. gündeki ağırlık ortalamaları	46
Tablo 7. Akciğer ağırlıklarının ortalamaları	47
Tablo 8. Alveol sayıları ve alveol çaplarının ortalamaları	47
Tablo 9. Ödem, fibrozis, konjesyon ve lökosit infiltrasyonunun 0, 1, 2 derece olmasının gruplara göre dağılımı	49
Tablo 10. α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığının ve hücrelerdeki boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması	49

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bronkopulmoner displazi gelişimine katkıda bulunan etmenler	10
Şekil 2. Oksidatif stresin oluşumu	13
Şekil 3. Hafif bronkopulmoner displazi (Yaygın puslu görünüm)	18
Şekil 4. Ağır bronkopulmoner displazi (Aşırı havalanma ve heterojen görünüm)	18
Şekil 5. Kök hücre kaynakları	30
Şekil 6. Deney uygulama takvimi	36
Şekil 7. Deney düzeni. Alt rafta pleksiglastan yapılan hiperoksi odacığında çalışma grubundaki yavru sıçanlar ve anne sıçan, üst rafta oda havası soluyan yavru sıçanlar ve anne sıçan ile birlikte sağda hiperoksi düzeni görülmektedir	37
Şekil 8. Hiperoksi odacığının yakından görünümü	37
Şekil 9. Orta hat boyun kesisi	41
Şekil 10. Trakeanın bulunması	41
Şekil 11. Trakeal yolla serum fizyolojik, medyum, vasat ve mezenkimal kök hücre verilmesi	41
Şekil 12. Cilt-cilt altı dokuların kapatılması	41
Şekil 13. Normoksik ve hiperoksik sıçanların yedinci gündeki büyüklük farkı	46
Şekil 14. Normoksik ve hiperoksik sıçanların yirminci gündeki büyüklük farkı	46
Şekil 15. A'da hiperoksi uygulanıp plasebo verilen, B'de hiperoksi uygulanıp medyum verilen ve C'de hiperoksi uygulanıp vasat verilen grupların akciğer makroskopilerinde yer yer kanama alanları, kistik yapılar ve düzensiz akciğer doku yüzeyi izlenmektedir. D'de hiperoksi uygulanıp MKH verilen grubun akciğer dokusunda kanama ve düzensizliğin daha az olduğu ve E'de sham ve F'de normoksik kontrol gruplarında normal akciğer dokusu olduğu izlenmektedir	50
Şekil 16. Oda havası soluyan grupta (Grup N) düzenli yapıda akciğer parankimi izlendi (Hematoksilen-eozinX200)	51
Şekil 17. Sham grubunda (Grup S) düzenli yapıda akciğer parankimin alanlarında yer yer konjesyon bulguları (ok ile işaretli) izlendi(Hematoksilen-eozinX200).....	51
Şekil 18. Hiperoksi+plasebo grubunda (Grup P) akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli) ve hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).....	51
Şekil 19. Hiperoksi+medyum (Grup M) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli) ve yer yer inflamatuvar hücre serpintileri (ok ucu ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozin X200)	51
Şekil 20. Hiperoksi+vasat (Grup V) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli), inflamatuvar hücre serpintileri (ok ucu ile işaretli) ve alveol lümenlerinde ödem sıvısı (üçgen ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).....	52
Şekil 21. Hiperoksi+MKH (Grup MKH) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ucu ile işaretli) ve inflamatuvar hücre serpintileri (ok ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200)	52
Şekil 22. MKH verilmesinden bir hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400)	53
Şekil 23. MKH verilmesinden iki hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400)	53
Şekil 24. MKH verilmesinden üç hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400)	54

Şekil 25. MKH verilip 57. günde akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ince ok) (X200).....	54
Şekil 26. Negatif kontrolde GFP (+) hücreler (ok) (X200).....	55

KISALTMA LİSTESİ

ADDA	: Aşırı düşük doğum ağırlıklı
BPD	: Bronkopulmoner displazi
CPAP	: Continuous Positive Airway Pressure (Devamlı pozitif hava yolu basıncı)
ÇDDA	: Çok düşük doğum ağırlıklı
DDA	: Düşük doğum ağırlıklı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EPH	: Endotelyal projenitör hücre
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)
GFP	: Green Fluorescent Protein (Yeşil floresan proteini)
GH	: Gebelik haftası
HİE	: Hipoksik iskemik ensefalopati
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IU	: İnternasyonal ünite
iNO	: İnhale nitrik oksit
KAH	: Kronik akciğer hastalığı
MKH	: Mezenkimal kök hücre
NEK	: Nekrotizan enterokolit
OH[•]	: Hidroksil radikali
paO₂	: Kısmi arteriyel oksijen basıncı
pCO₂	: Kısmi karbondioksit basıncı
PDA	: Patent duktus arteriyosus
PPHN	: Persistant Pulmonary Hypertension (Yenidoğanın devamlı pulmoner hipertansiyonu)
PR	: Prematüre retinopatisi
RDS	: Respiratuar distress sendromu
SMA	: Smooth Muscle Actin (Düz kas aktin)
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGF	: Transforming Growth Factor (Dönüştürücü büyüme faktörü)

ÖZET

DeneySEL HİPEROKSİ ARACILI AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN SİÇANLARDA TRAKEAL YOLLA VERİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Çalışmamızda deneysel hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlara erişkin sıçanın kemik iliğinden üretilen ve trakeal yolla verilen mezenkimal kök hücrelerin histopatolojik olarak akciğerlere etkisini ve akciğer dokusuna yerleşimini göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Sıçan yavrularına doğumdan sonraki 10 gün % 85-95 yoğunlukta oksijen uygulanarak hiperoksik akciğer hasarı modeli oluşturuldu. Sıçanlar doğumdan itibaren altı gruba ayrıldı: Oda havası soluyan normoksi grubu (n=11), oda havası soluyan cerrahi ve anestezi uygulanan sham grubu (n=11), hiperoksi uygulaması yapılan ve plasebo olarak serum fizyolojik (n=9), mezenkimal kök hücrenin üretileceği sıvı besiyeri (medyum) (n=10), mezenkimal kök hücreler üretilip kaldırıldıktan sonra kalan sıvı besiyeri (vasat) (n=8) ve mezenkimal kök hücre (n=17) verilen gruplar çalışma gruplarını oluşturdu. 10. ve 57. günde sıçan ağırlıkları karşılaştırıldı. 57. günde akciğer dokusu patolojik inceleme için çıkarıldı ve akciğer ağırlıkları kaydedildi. Kök hücrelerin akciğerlere yerleşimi, alveol sayısı, alveol çapı, α -düz kas aktin ekspresyonu ve ödem, fibrozis, konjesyon, lökosit infiltrasyonu gelişimi değerlendirildi.

Bulgular ve Sonuç: Hiperoksik gruplarda 10. günde izlenen ağırlık kaybı normoksik gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı idi.

Hiperoksik gruplardan plasebo ve medyum verilen grupların akciğer ağırlığında normoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan artış vardı. Mezenkimal kök hücre verilen grupta akciğer ağırlığı diğer hiperoksik gruplara göre azalmış olarak bulundu.

Hiperoksi uygulanan gruplardan sadece mezenkimal kök hücre verilen grupta alveol sayısının arttığı, normoksi grubuyla farklılık olmadığı saptandı. Plasebo, medyum ve vasat verilen gruplarda ise normoksi grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı olan alveol sayısı azalması vardı. Mezenkimal kök hücre verilmesi alveol sayısını arttırmıştı.

Hiperoksi uygulanıp plasebo ve medyum verilen gruplarda normoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olan alveol çapı artması vardı. Mezenkimal kök hücre ve vasat verilen gruplarda alveol çapı azalmış ve normoksi grubuna yaklaşmış olup gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Kök hücre ve vasat verilmesi alveol çapını azaltmıştı.

Mezenkimal kök hücre verilen grupta akciğerlerde histopatolojik olarak birinci derece ödem gelişimi diğer hiperoksik gruplara göre daha az bulundu.

α -Düz kas aktin ekspresyonu vasat ve mezenkimal kök hücre verilen gruplarda plasebo verilen gruba belirgin olarak azalmıştı.

İşaretli mezenkimal kök hücre verilen tüm gruplarda, akciğer dokusunda yeşil floresan protein (+) hücrelere rastlandı. Sürfaktan proteini-C ile ikili işaretlemede, yeşil floresan protein (+) hücrelerin bazılarının aynı zamanda sürfaktan proteini-C'yi de eksprese ettiği gözlemlendi. Verilen mezenkimal kök hücrelerin akciğerlere yerleştiği ve tip II alveolar epitelyal hücreye benzer şekilde sürfaktan ürettiği kanaatine varıldı.

Sonuç olarak, hiperoksi aracılı akciğer hasarında yenidoğan sıçanlara mezenkimal kök hücre verilmesi ile akciğer dokusunda histopatolojik olarak iyileşme olduğu, verilen mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokuya yerleştiği ve o dokunun hücrelerine dönüştüğü saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Akciğer hasarı, hiperoksi, mezenkimal kök hücre, bronkopulmoner displazi

ABSTRACT

Evaluation of the effectiveness of tracheally delivered mesenchymal stem cells on experimental hyperoxic lung injury in neonatal rats

Aim: The aim of this study was to evaluate the effectiveness of tracheally delivered mesenchymal stem cells derived from adult rat bone marrow on lung histopathology and placement of mesenchymal stem cells in lung tissue in an experimental neonatal rat model of hyperoxic lung injury.

Materials and Methods: In order to create the hyperoxic lung injury model, neonatal rat pups were exposed to 85-95 % oxygen, after birth until the end of the 10th day. Rats were divided into six groups from birth: (1) Room air breathing rats in normoxia group (n=11), (2) room air breathing and surgery and anesthesia applied rats in sham group (n=11), (3) exposed to hyperoxia and physiological-serum administered placebo group (n=9), (4) exposed to hyperoxia and medium (where mesenchymal stem cells were reproduced) administered group (n=10), (5) exposed to hyperoxia and vehicle (remaining material after harvesting mesenchymal stem cells) administered group (n=8), and (6) exposed to hyperoxia and mesenchymal stem cells administered group (n=17). Weights of rats were compared on the 10th and 57th days. Lung tissue was removed for pathological examination and lung weight was recorded on the 57th day. The placement of mesenchymal stem cells in the lungs, the number and the diameter of alveoli, α -smooth muscle actin expression and edema, fibrosis, congestion and leukocyte infiltration were assessed.

Results and Conclusion: The weight of rats decreased significantly in hyperoxic groups when compared with normoxic groups on the 10th day.

Lung weight increased significantly in both “hyperoxia-exposed, placebo-administered” group and the “hyperoxia-exposed, medium-administered” group when compared with the normoxia group. Compared to other hyperoxic groups, the weight of lungs showed some decrease in mesenchymal stem cells-administered group.

In hyperoxic groups, the number of alveoli increased only in the mesenchymal stem cells-administered group and there was no statistically significant difference when compared with the normoxia group. The numbers of alveoli in placebo-administered, medium-administered and vehicle-administered groups were significantly decreased when compared with the normoxia group. Administration of mesenchymal stem cells increased the number of alveoli in rats exposed to hyperoxia.

Alveoli diameter increased significantly in “hyperoxia exposed, placebo-administered” and “hyperoxia exposed, medium-administered” groups when compared with the normoxia group. On the other hand, the diameter of alveoli significantly decreased in mesenchymal stem cells-administered and vehicle-administered groups; and no statistically significant difference was observed when compared with the normoxia group. Administration of mesenchymal stem cells or vehicle decreased the diameter of alveoli in rats exposed to hyperoxia.

Development of first degree edema in lungs in mesenchymal stem cells-administered group was less than other hyperoxic groups.

Expression of α -smooth muscle actin decreased significantly in mesenchymal stem cells-administered and vehicle-administered groups when compared with the placebo-administered group.

The green fluorescent protein (+) cells in the lung tissue were encountered in all labeled mesenchymal stem cells-administered groups. Some green fluorescent protein (+) mesenchymal stem cells did also exhibit expression of surfactant protein-C indicating that

some of the mesenchymal stem cells settled in lungs transformed to type II alveolar epithelial cells and produced surfactant.

In conclusion, administration of mesenchymal stem cells improved lung histopathology in experimental hyperoxic lung injury model in neonatal rats. Mesenchymal stem cells were also placed in the damaged lung tissue and transformed to alveolar epithelial cells.

Key words: Lung injury, hyperoxia, mesenchymal stem cell, bronchopulmonary dysplasi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bronkopulmoner displazi (BPD), erkendoğan bebek ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden olup hastaya, ailesine ve topluma maddi ve manevi ağır yükler getirmektedir. BPD gelişen erkendoğan bebekler uzun süre yoğunbakım ünitelerinde tedavi görmek ve taburcu olduktan sonra da sık sık hastaneye yatmak zorunda kalmaktadır. BPD görülme sıklığı, çeşitli toplumlara ve merkezler arasında tedavide uygulanan farklı protokollere göre değişiklik göstermekle birlikte, 1500 gr altındaki bebeklerde yaklaşık % 25 olarak bildirilmiştir.^{1,2} Bu oran 1000 gram altındaki bebeklerde % 33'tür. BPD'nin önlenmesi kolay olmadığı gibi henüz kesin bir tedavisi de yoktur. Yakın zamana kadar BPD'de birçok tedavi seçeneği araştırılmış, bunlardan sadece kortikosteroidler ve A vitamininin etkinliği kanıtlanabilmiştir.³⁻⁵

Doğum öncesi dönemde kortikosteroid uygulaması, doğumdan sonra sürfaktan ve prematüre apnesinde kafein uygulamalarının dolaylı olarak BPD'yi azaltabileceği gösterilmiştir. E vitamini, C vitamini, antioksidan maddeler, inhale nitrik oksit, diüretik kullanımı, izin verilebilir karbondioksit yüksekliği uygulamaları, hacim hedefli ventilasyon, devamlı pozitif hava yolu basıncı (Continuous Positive Airway Pressure, CPAP) yüksek frekanslı ventilasyon uygulamaları, H₂ reseptör blokerleri, solunum yolundaki Üreoplazma kolonizasyonunun makrolidlerle tedavisi gibi birçok tedavi şekilleri üzerindeki çalışmalarda bu uygulamaların BPD'yi azalttığını gösteren kanıtlar saptanmamıştır.

Son yıllarda BPD tedavisinde ilgi mezenkimal kök hücre tedavisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Enjekte edilen fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, akciğer de dahil, çeşitli hematopoetik olmayan dokularda o dokunun parankimal hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir.⁶ Bu yöntem yenidoğanın doğumsal metabolik, nörodejeneratif ve kalp-damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmak istenmektedir.^{7,8} Ancak alveolar hasarla giden akciğer hastalıklarında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisiyle ilgili çalışmalar çok azdır. Erişkin akciğer hasar modellerinde, kemik iliğinden türetilen hücrelerin akciğere yerleşebildiği ve çeşitli akciğer hücre fenotiplerine dönüşebildiği izlenmiştir.^{9,10} Yapılan bir çalışmada, hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda geriye dönüşümsüz alveolar ve kapiller azalma olduğu, bunun BPD'deki patolojik bulgulara oldukça benzediği, kemik iliğinden elde

edilen kök hücre verilmesi ile alveolar büyümede duraklamanın ve alveollerde sayıca azalmanın önlendiği, sıçanların yaşayabilirliğinin ve egzersiz kapasitesinin arttığı ile ilgili kanıtlar elde edilmiştir.¹¹

Bu çalışmada, henüz kesin bir tedavi yöntemi olmayan BPD'de mezenkimal kök hücre tedavisinin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. BPD modeli oluşturmada hiperoksi aracılı akciğer hasar modeli kullanılmıştır. Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda kemik iliğinden üretilen ve trakeal yolla verilen mezenkimal kök hücre tedavisi sonucunda kök hücrelerin akciğer dokusuna yerleşimi ve akciğerde patolojik değişikliklerde iyileşme olup olmadığı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Bronkopulmoner displazi (BPD), erkendoğan bebeklerde görülen akciğer dokusunda yangı, fibrozis ve alveollerde gelişim duraklaması ve/veya bozukluğu sonucu gelişen kronik bir akciğer hastalığıdır.¹² İlk tanımlamalar mekanik ventilasyon ve oksijen tedavisi alan bebeklerin klinik, radyolojik ve patolojik akciğer değişikliklerine göre yapılmıştır. Buna göre BPD klinik ve radyolojik olarak dört evreye ayrılmıştır:

- Evre 1 (1-3 gün): Klinik olarak respiratuar distress sendromu (RDS) bulguları vardır. Akciğer grafisinde retikülogranüler görünüm ve hava bronkogramları izlenir.

- Evre 2 (4-10 gün): Klinik olarak oksijen ihtiyacında artma, çekilmeler ve raller vardır. Akciğer grafisinde hava bronkogramları, opak sahalar, genellikle interstisyel hava izlenir.

- Evre 3 (10-20 gün): Klinikte oksijen bağımlılığı devam eder. Grafide aşırı havalanmanın olduğu kistik alanlar ve atelektazik alanlar birlikte izlenir.

- Evre 4 (>30 gün): Kronik akciğer hastalığı bulguları; fiçi göğüs, ekspiratuar hışıltı ve raller vardır. Grafide konsolidasyon ve aşırı havalanma vardır.

Bu radyolojik bulgulara ek olarak; en az üç gün yardımcı solunum desteği gereksinimine yol açan solunum yetmezliği bulguları varlığında, gebelik yaşı 32 hafta ve üzerindeki erkendoğanlarda doğumdan sonra 28. günde, gebelik yaşı 32 haftadan küçük erkendoğanlarda döllemeden sonra 36. haftada devam eden oksijen bağımlılığı tanıma eklenmiştir.¹³ Halen birçok Yenidoğan Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı bu tanımlamayı kullanmaktadır.

BPD, mekanik ventilatör ve oksijen tedavisi uygulanan RDS'si olan erkendoğan bebeklerde bu tedavilere bağlı gelişen akciğer hastalığı olarak tanımlanmış olmakla birlikte başlangıçta akciğer hastalığı hafif olan çok küçük bebeklerde de görülmesi ile tanımlama düzenlenmiştir.^{14,15} Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü, Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü ve Nadir Görülen Hastalıklar Bölümü'nün desteklediği çalışmalarla günümüzde geçerli olan BPD tanımı yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Bronkopulmoner displazinin tanı ölçütleri

En az 28 gün süreyle >% 21 oksijen tedavisi alma ve süregelen solunum sıkıntısına ek olarak;		
	Gebelik yaşı <32 hafta	Gebelik yaşı ≥32 hafta
Değerlendirme zamanı:	Döllenme sonrası yaş 36. hafta veya taburculuk (hangisi önce gelirse)	Döllenme sonrası yaş >28 gün ve <56 gün veya taburculuk (hangisi önce gelirse)
BPD şiddeti:		
Hafif	Oda havası solumak	Oda havası solumak
Orta	<%30 oksijen gereksinimi	<%30 oksijen gereksinimi
Ağır	≥%30 oksijen ve/veya pozitif basınçlı ventilasyon gereksinimi	≥%30 oksijen ve/veya pozitif basınçlı ventilasyon gereksinimi

2.2. Epidemiyoloji

Tüm doğumların yaklaşık % 10'u erken doğumdur.¹⁶ BPD sıklığı tanıma göre değişkenlik göstermektedir. Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü Yenidoğan Araştırma Grubu'nun çok merkezli çalışmasında doğum ağırlığı 500-1500 gram arası değişen erkendoğan bebeklerde döllenme sonrası 36. haftada oksijen bağımlılığının devam etme kriterine göre sıklık % 3 ile % 43 arasında bulunmuştur.¹⁷ BPD, erkendoğan bebek ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden olup hastaya, ailesine ve topluma maddi ve manevi ağır yükler getirmektedir. BPD gelişen erkendoğan bebekler uzun süre yoğunbakım ünitelerinde tedavi görmek ve taburcu olduktan sonra da sık sık hastaneye yatmak zorunda kalmaktadır. BPD'nin önlenmesi kolay olmadığı gibi henüz kesin bir tedavisi de yoktur.

BPD görülme sıklığı çeşitli toplumlara (neonatal risklerin farklı olması) ve merkezler arasında tedavide uygulanan farklı protokollere göre (örneğin; kabul edilebilir oksijen saturasyonu sınırı) değişiklik gösterir. BPD olgularının % 97'sinin 1250 gramdan küçük bebeklerde olduğu izlenmektedir.¹⁸ NICHD'nin 1997-2002 yılları arasında 18.000 çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebekte yaptığı çalışmaya göre doğum ağırlığı azaldıkça BPD sıklığı artmaktadır.¹ BPD 36. haftada oksijen ihtiyacının devam etmesi olarak tanımlanmış ve buna göre sıklık % 25 olarak saptanmıştır. Bu çalışmadaki doğum ağırlığına göre BPD görülme sıklığı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Doğum ağırlığına göre bronkopulmoner displazi sıklığı

Doğum ağırlığı (gram)	Sıklık (%)
1251-1500	6
1001-1250	14
751-1000	33
501-750	46

1994-2002 yılları arasında, altı yenidoğan ünitesinde yapılan geçmişe dönük kohort çalışma sonuçlarına göre BPD sıklığı, 33 haftadan önce doğan bebeklerde % 12 olarak saptanmıştır.² Ağır BPD oranında yenidoğan ünitelerindeki bakım ve tedavilerde düzelmelere (doğum öncesi dönemde steroid, doğum sonrasında sürfaktan, yoğun ventilatör ve oksijen tedavisinden kaçınma gibi) bağlı olan azalma izlenmiştir. Ancak, başlangıçta akciğer hastalığı hafif olan çok küçük (28. gebelik haftasından küçük) bebeklerde görülen, daha ılımlı seyreden akciğer hasarı tanımlanmış ve buna “yeni BPD” denmiştir. Günümüzde daha küçük bebeklerin yaşatılabilmesi ve yoğunbakım tedavilerinin düzelmesiyle, ventilatör tedavisi ve oksijen toksisitesine bağlı gelişen eski BPD olgularının yerini yeni BPD olguları almıştır.

2.3. Patofizyoloji

2.3.1. Normal Akciğer Gelişimi

İnsanlarda akciğerlerin fizyolojik gelişimi büyük histolojik değişimlerin olduğu birbiri içine geçen beş dönemde gerçekleşir.^{19,20}

- Embriyonik dönem (döllenme sonrası 26. gün ile 7. gebelik haftası arası): Primordiyal önbağırsaktan köken alan ventral divertikül trakeayı oluşturur. Trakea dallanıp akciğerlere ana bronşlarını verir. Bu dönemde büyüme faktörleri önemli düzenleyici etkilere sahiptir.

- Psödoglandüler dönem (7-16. gebelik haftaları arası): Uç bronşioelleri oluşturacak dokular farklılaşır ve preasiner damarlar gelişmeye başlar.

- Kanaliküler dönem (16-26. gebelik haftaları arası): Broşiyal epitelden tip II epitel hücreleri farklılaşır ve küboidal hücrelere dönüşür. Solunumsal bronşiyoller oluşur. Özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) etkisiyle mezenkimal damarlanma artar. 20. haftada kapillerlerin vaskülogenez ile oluşması sonucu distal pulmoner dolaşım gelişir. İnterstisyel dokular azalır ve ilerdeki gaz değişim üniteleri oluşur. Distal küboid epitelin tip I ve II epitelyal hücreye dönüşümü tamamlanır.

- Sakküler dönem (26/28-32/36. gebelik haftaları arası): Kesecik duvarlarının interstisyumunda azalma olur. Alveolar gelişimin öncülleri olan ikincil yarıklar silindirik keseciklere bölünür. Bu dönemde pulmoner parankim boyutları artar ve

sümfaktan üreten sistem olgunlaşır. Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesiyle hava boşlukları arasında yer alan bağ dokusu incilir.

- Alveolar dönem: 32-36. gebelik haftalarında başlayıp doğum sonrası iki yaşına kadar devam eder.

Sakküler dönemde ikincil krestin belirmesiyle alveoller oluşmaya başlar. Alveolar septanın çift kapiller tabakasının tek tabakaya dönüşmesi ile mikrovasküler olgunlaşma gerçekleşir. 32. gebelik haftasında akciğerlerde olgun alveollere rastlanabilir, ancak tüm alveollerin olgunlaşması 36. haftaya kadar sürer.²¹

Sümfaktan uygulanması sonrası bile 24-28. gebelik haftasında doğan bebekler BPD için yüksek risk altındadır. Bu dönemde geç kanaliküler veya sakküler dönemde olan gelişen akciğerde hava yolları ile akciğer damarları yanyanadır. Sümfaktan, erkendoğanın akciğerinde biyokimyasal ve işlevsel değişiklik yapmakta ancak yapısal immatüriteye etki sağlamamaktadır. Bu nedenle kesecik, alveoller ve bunların altındaki kapiller ağın gelişiminin nasıl olduğunun ve BPD’de bu mekanizmaların nasıl duraklamaya uğradığının bilinmesi alveolar yapının bozulması ile giden akciğer hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynar.

2.3.2. Akciğerlerde Damarsal Gelişim

Son zamanlarda akciğerlerin damarsal gelişiminin düzenlenmesine ve damarsal gelişimin akciğer gelişimindeki rolüne odaklanılmıştır. Pulmoner dolaşımın şekillenmesi iki temel olay olan vaskülogenezis ve anjiogenezise dayanır.

Vaskülogenezis, kan damarlarının anjioblast veya endotelyal öncü hücrelerden yeni olarak şekillenmesidir. Bunlar bölgesel büyüme faktörleri ve hücre dışı matrikse cevap olarak göç edip farklılaşırlar. Anjiogenezis ise önceden var olan damarlardan yeni kan damarları oluşumudur. Kabul gören genel görüş; distal damar ağının vaskülogenezis ile oluştuğu, akciğer damar ağının anjiogenezis ile oluştuğu ise de bu halen tartışmalıdır.²² Vaskülogenezis, farelerde embiyonik 9. günde (E9), embiyonik akciğer mezenşimindeki kan adacıklarından kan damarlarının yeni olarak şekillenmesi ile olur. Anjiogenezis, E12’de, merkezi akciğer damar gövdesinden arter ve venlerin filizlenmesi ile başlar.²³ Yaklaşık E14’te çevresel sinüsoidlerin ve merkezi damarların filizleri birleşerek damar ağını oluşturur. Çevresel ve merkezi damarsal yapılardaki bu birleşmeye beraberinde hava yollarındaki dallanmanın da olduğu yaygın damarsal

dallanma eşlik eder. İnsan fetal akciğerinde yapılan çalışmalarda da hava yollarının pulmoner arterlerin gelişiminde bir şablon görevi gördüğü izlenmektedir.²⁴ Yapılan bir çalışmada akciğer morfogenezinin yeni mekanizmasının distal anjiogenezis ile birlikte olduğu ve bunun akciğer gelişimi başlangıcından (farelerde E9,5) psödoglandüler döneme (E13,5) kadar devam ettiği izlenmiştir. Bu modelde terminal tomurcuk etrafındaki kapiller ağ akciğer morfolojik bulgularından ilk ortaya çıkanıdır ve ardından akciğer tomurcuklarının büyümesi ile yeni kapillerler genişleyerek yayılır.²²

Mikrovasküler olgunlaşmanın son önemli basamağı akciğer gelişiminin alveoler dönemi ile iç içe girmiştir.²⁵ Olgunlaşmamış gaz değişim bölgesindeki çift kapiller tabaka tek tabaka haline (sıçanlarda doğum sonrası 3. haftada tamamlanan süreçtir) gelir. Alveol duvarı incelik ve hücresel yapısı değişir. Sıçanlarda, alveolar duvar kalınlığı ve alveolar gaz ile kan kapillerleri arasındaki hava-gaz bariyeri % 20-25 azalır. Doğum ile ergenlik dönemi arasındaki dönemde alveolar ve kapiller yüzey alanı 20 kat ve kapillerlerin hacmi 35 kat artar.

2.3.3. Bronkopulmoner Displazide Akciğer Gelişiminde Duraklama

Zamanından önce doğum ile akciğer gelişimindeki sıra kesintiye uğrar. Sonuç olarak izlenen histolojik bulgu; alveollerde basitleşme (büyük ama sayıca azalmış alveoller), septasyonda azalma, bozulmuş damarsal büyümedir. BPD'nin çeşitli hayvan modellerinde ve BPD nedeniyle ölen insan otopsilerinde sayıca azalmış küçük arterler ve distal akciğer damarlarında normal olmayan dağılım vardır.^{26,27} Uzun ve kısa süre mekanik ventilasyon uygulanan bebeklerin ölüm sonrası akciğerlerinde mikrovasküler büyümeyi niceliksel olarak değerlendiren bir çalışmada, arterlerde damarsal dallanmanın azalmış olduğu doğrulanmıştır. Fakat ilginç olarak, bir endotelial hücre belirteci olan, akciğer trombosit endotelial hücre adhezyon molekülü-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1) proteini kısa süre mekanik ventilasyon uygulanıp ölen bebeklerde azalmışken, uzun süre mekanik ventilasyon uygulananlarda artmıştır. Bu bulguya göre; damar sayısının azalmış olarak kalmasına rağmen endotel çoğalmasında geçici bir azalma, ardından ani bir çoğalma cevabı olmaktadır.²⁸ Öyleyse BPD'de bozuk biçimdeki akciğer büyümesi her zaman endotelial hücrelerin sayıca azalması ile sonuçlanmaz.

BPD'de bozuk büyümeye ek olarak, akciğer damar yatağında hipertansif yapısal

yeniden şekillenme vardır. Büyük arterlerin medial tabakasında aşırı büyüme ve küçük periferik arterlerde distal kas tabakasında artış izlenir.²⁹ Son dönemlerdeki hayvan çalışmalarında, pulmoner hipertansiyonun doğrudan damarsal büyümeyi baskılayabildiği ve akciğer gelişiminde alveolarizasyonu bozduğu izlenmiştir. Bu da BPD’de normal olmayan akciğer yapısının mekanizmasında hemodinamik stresin ek katkısı olduğunu düşündürmektedir.³⁰

Alveolarizasyona katkıda bulunan birçok yolak vardır; elastin, trombosit türevi faktör (Platelet-Derived Factor, PDF), fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor, FGF), dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming Growth Factor, TGF) bunlardan bazılarıdır.³¹ Normal alveolar gelişim için gereken mekanizmanın ve sinyal-iletim yolağının nasıl kesintiye uğradığı halen açık değildir. Öne sürülen hipotezlere göre, akciğer gelişiminin kritik döneminde anjiogenezde duraklama alveolarizasyonu bozmakta ve akciğerin az gelişmişliğine katkıda bulunmaktadır.³² Buna göre:

- Anjiogenezde duraklama alveolarizasyonu bozmaktadır,
- BPD’de, damarlarda azalma ve şekil bozukluğu, alveollerde ve anjiogenik büyüme faktörlerinde azalma olmaktadır,
- Anjiogenezin artırılması ve endotelial kaybın önlenmesi, damarsal ve alveolar büyümeyi uyarak deneysel BPD modelinde akciğer yapısını iyileştirir.³³⁻³⁵

Deneysel ve insan yenidoğan BPD çalışmalarında, distal hava yolunun koordinasyonunun ve damarsal büyümenin normal alveolarizasyon için temel olduğu belirtilmektedir. Birkaç anjiogenik faktör içinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) rolü kesinlikle çok önemlidir. VEGF etkin bir “endotelial hücreye özgü mitojen”dir. Damar büyümesini ve yeniden şekillenmesini uyarır. VEGF reseptörlerinin (VEGF-1 ve VEGF-2) her birinin baskılandığı çalışmalarda ölümcül fenotipler oluşmuş, bunlarda endotelial hücrelerin düzeninin bozulduğu izlenmiştir. VEGF’in birçok izoformu (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈) vardır.³⁶ Bunlar tip II alveolar epitelial hücrelerde bulunurlar. Fare akciğerinde damar büyümesinin en fazla olduğu kanaliküler dönemde en yüksek seviyede salındığı ve doğum sonrası 10. güne kadar azalma sürecine girdiği, daha sonra ergenlik dönemine kadar süren artışın olduğu saptanmıştır. VEGF’in farmakolojik ve genetik baskılanması ile alveol yapısı bozulmaktadır. Bu durum VEGF’in, akciğer damar yatağının ve alveolar yapının adölesan çağa kadarki gelişiminde ve sürdürülmesinde gerekliliğini

göstermektedir.

2.3.4. Eski ve Yeni Bronkopulmoner Displazi Patofizyolojisi

Sürfaktan tedavisinden önceki dönemlerde BPD'nin baskın patolojik bulgusu hava yolu hasarı, yangı ve fibrozis idi. Son zamanlarda ise BPD'den ölen bebeklerin akciğer patolojilerinde daha az fibrozis ve daha fazla tek tip inflasyon izlenmektedir. Büyük ve küçük hava yollarında belirgin epitelyal metaplazi, düz kas hipertrofisi ve fibrozis olmaksızın az sayıda, septasyonu azalmış ve genişlemiş alveoller vardır. Ayrıca akciğer mikrovaskülarizasyonda da azalma izlenir. Yaşayan bebeklerin akciğer biyopsi örneklerinde de benzer şekilde alveolarizasyonda azalma vardır.³⁷⁻³⁹

Tablo 3. Eski ve yeni bronkopulmoner displazi patolojisindeki farklar

Sürfaktan öncesi “eski BPD”	Sürfaktan sonrası “yeni BPD”
Atelektatik ve aşırı havalanma alanlarının birlikteliği	Daha az heterojen bölgesel değişimler
Hava yolu epiteli hasarı ağır	Hava yolu epiteli hasarı önemsiz düzeyde (hiperplazi, skuamöz metaplazi gibi)
Hava yolu düz kas kalınlaşması artmış	Hava yolu düz kaslarında hafif kalınlaşma
Yaygın fibroproliferasyon	Hafif fibroproliferatif değişiklikler
Pulmoner arterlerde hipertansif yeni şekillenmeler	Azalmış ve şekli bozulmuş arterler
Alveolarizasyonda ve yüzey alanında azalma	Az sayıda, genişlemiş ve basitleşmiş alveoller

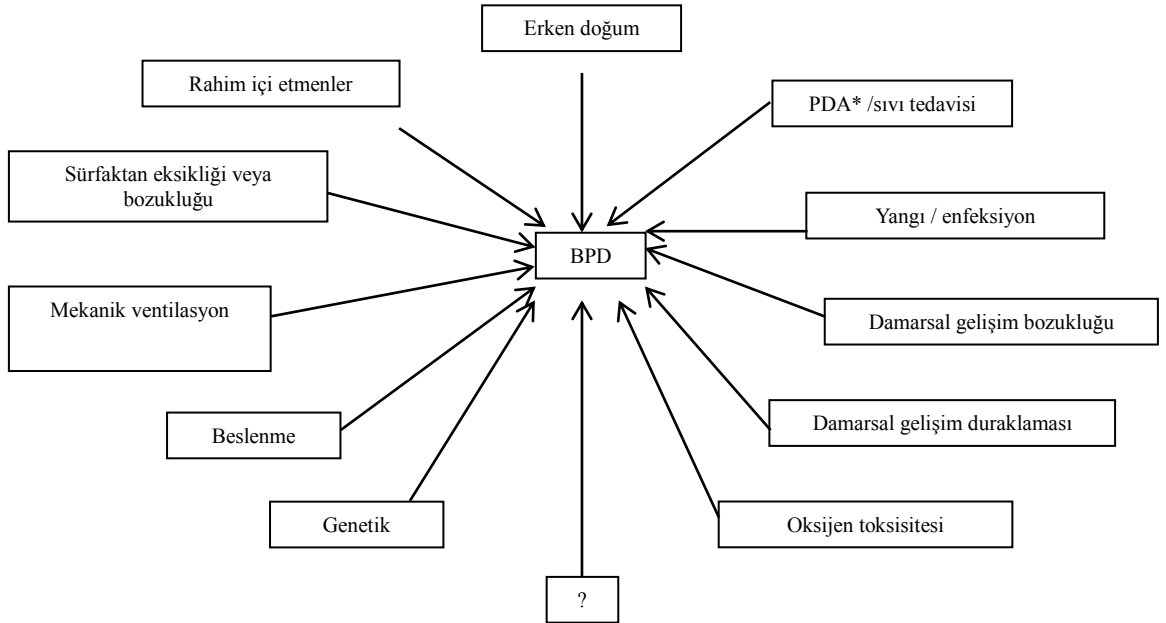
Sürfaktan tedavisi uygulanan aşırı düşük doğum ağırlıklı (ADDA) bebeklerde BPD'nin tipik patolojik bulgusu akciğer gelişiminde duraklama olup bu “yeni BPD” olarak tanımlanmaktadır.^{14,40} Bu hastaların akciğer patolojisinde azalmış septasyon ve alveolar az gelişmişlik olup daha az sayıda ve iç çapı artmış alveoller izlenir. Böylece gaz değişimi için gerekli yüzey alanı azalmış olur. Ayrıca akciğer damar yatağının gelişiminde ve alveolar kapillerlerde normal olmayan dağılım, akciğer arteriollerinin düz kas tabakasında kalınlaşma ve bunun sonucu olarak artmış akciğer damar direnci vardır. Eski BPD ile karşılaştırıldığında yeni BPD'de hava yolu hasarı ve yangı daha az izlenir. Ayrıca yeni BPD'de elastik doku oluşumunda artma olup bu doku bozukluğu septasyonun ve kapillerlerin gelişiminin bozulmasına neden olur. Sürfaktan tedavisi öncesi dönemde görülen hava yolu hasarı, yangı ve fibrozis mekanik ventilasyon ve oksijen toksisitesine bağlı olup sürfaktan tedavisi alan ağır BPD'li bebeklerde de benzer bulgular izlenebilir. Ağır hastalığı olan bu bebeklerde fibrozis, düz kas kalınlaşması ve interstisyel ödem (eski BPD bulguları) yeni BPD'deki azalmış alveol ve kapiller sayısı üzerine eklenmektedir. Eski ve yeni BPD patolojisindeki farklar Tablo 3'te

gösterilmiştir.

2.4. Bronkopulmoner Displazinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Erkendoğan bebeğin akciğerinde yangı, akciğer gelişiminin duraklaması ve ağır hasara neden olarak BPD gelişimine yol açan doğum öncesi ve sonrası birçok etmen vardır (Şekil 1). Bu etmenlerin etkileri birbiri üzerine eklenmektedir. Aşırı Düşük Doğum Ağırlığı Olan Yenidoğanlar Çalışması (Extremely Low Gestational Age Newborns Study, ELGANS) grubunun yaptığı ileriye dönük çalışmada; bebeğin çok küçük olması (düşük gebelik yaşı), yaşamın ilk 14 gününde % 25'ten fazla oksijen ihtiyacının olması ve yaşamın ilk haftası boyunca mekanik ventilasyon gereksiniminin olması BPD gelişimi için tahmin değeri olan risk faktörleri olarak belirtilmiştir.⁴¹

Kuzey Carolina'da 1244 çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebekte yapılan çalışmada; yaşamın ilk 48 saatinde mekanik ventilasyon gereksinimi, hastane kaynaklı enfeksiyon, ilk iki günde artmış sıvı alımı BPD gelişmesinde önemli risk faktörleri olarak gösterilmiştir.⁴² İlk 48 saatinde yapay solutulan bebeklerde PDA'nın (Patent Duktus Arteriyozus) artmış saptanması BPD riskinde artış ile ilişkili bulunmuştur.⁴³ Son zamanlarda preeklampsinin tek başına BPD gelişimi için risk olduğu tanımlanmıştır.



*: PDA, patent duktus arteriyozus

Şekil 1. Bronkopulmoner displazi gelişimine katkıda bulunan etmenler

2.4.1. Erken Doğum

Akciğerler 23-32. gebelik haftasında yani sakküler dönemde hasarlanmaya oldukça duyarlıdır.^{25,44} Bu evrede olgunlaşmamış akciğerlerin destek yapıları henüz gelişmemiştir, sürfaktan yetersizdir, genişleyebilme yeteneği azdır, antioksidan mekanizmalar yeterince gelişmemiştir ve yeterli sıvı temizlenmesi sağlanamaz.^{25,45} Olgunlaşmamış akciğerlerin yapısal ve işlevsel olarak olgun olmaması, alveollerin ve akciğer damarlarının gelişimindeki bozulmada diğer nedenlere göre daha önemli olan bir risk faktörüdür.

Erkendoğan bebeklerde (özellikle 28. gebelik haftasından küçük olanlarda), fetal büyüme kısıtlılığının olması BPD için bağımsız risk faktörüdür.⁴⁶ Büyüme kısıtlılığının akciğer hasarı üzerinde önemli etkileri vardır.

2.4.2. Mekanik Ventilasyon

Mekanik ventilasyon; yüksek basınçlar nedeniyle barotravma, aşırı hacim uygulamaları ile volüt travma, sürfaktan eksikliği olan alveollerde tekrarlayan açılıp kapanmalar ile atelektotravma ve sonuçta artmış proinflatuar sitokinler aracılığı ile biyotravmaya neden olarak akciğerde hasar oluşturur.^{47,48}

Mekanik ventilasyon ile olan hasar, artmış hava yolu basıncından çok yüksek tidal hacim (volüt travma) uygulanması ile hava yollarında ve alveollerde aşırı gerilmeye bağlıdır.^{49,50} Yoğun mekanik ventilasyonun BPD gelişimindeki önemi ile ilgili kanıtlar olup günümüzde daha nazik ventilasyon yaklaşımları (yüksek tidal hacimden kaçınma gibi) uygulanmaktadır. Bu nedenle eski BPD'deki tipik hava yolu hasarı bulguları yeni BPD'nin ancak ağır olanlarında görülmektedir.

Mekanik ventilasyona bağlı olan akut akciğer hasarı aşırı genişlemeden dolayı olmaktadır. Olgunlaşmamış akciğerlere en yüksek akciğer kapasitesine yakın hacimlerin uygulanması BPD'deki bu kronik değişimlerin kaynağıdır. Yüksek tidal hacimler ile yoğun ventilasyon sonucu düşük karbondioksit düzeylerinin olması BPD gelişme riskini arttırmaktadır.⁵¹⁻⁵³

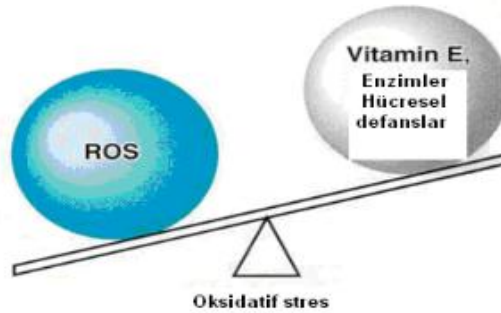
Pozitif basınçlı ventilasyon (PBV), tipik bronşiyal lezyonlara neden olur.⁵⁴ Hava yolu gelişiminde duraklama tedavinin erken dönemlerinde oluşur ve bu kendini akciğer direncinde artış olarak gösterir.⁵⁵ Yapılan bir çalışmada, yaşamın ilk beş günü mekanik ventilasyon uygulanan bebeklerden ilerde BPD gelişenlerde, BPD gelişmemiş olan

gruba göre akciğer direncinin belirgin şekilde yüksek olduğu izlenmiştir.⁵⁶ Bir başka çalışmada ise sürfaktan ile tedavi edilen maymunlardan yaşamın ilk beş günü mekanik ventilasyon uygulanan grup ile bir gün mekanik ventilasyon ve ardından devamlı pozitif hava yolu basıncı (Continuous Positive Airway Pressure, CPAP) uygulanan grup karşılaştırılmıştır. Uzun süre mekanik ventilasyon uygulanan grupta akciğer mekanikleri ve solunum işlevlerinde bozulma (azalmış arteriyel-alveolar oksijen oranı, yüksek parsiyel karbondioksit basıncı), artmış histopatolojik bulgular (hücresel bronşiolit, peribronşiyal alveolar duvarda kalınlaşma, lavaj sıvısında artmış sitokinler) saptanmıştır.⁵⁷

Bildirilen BPD oranları merkezler arasında çeşitlilik göstermekte olup bu durum mekanik ventilasyon uygulamalarındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. 1991-1993 yılları arasında Boston'da iki ve New York'ta bir hastanenin katıldığı, 452 ADDA'lı bebekte yapılan çalışmada Boston'da BPD sıklığı New York'tan yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 22 ve % 4). Boston'da başlangıç solunum tedavisi olarak mekanik ventilasyon uygulanması (% 75'e karşı % 29) ve sürfaktan kullanımı daha fazla (% 45'e karşı % 10) bulunmuştur.⁵⁸

2.4.3. Oksijen Toksisitesi

Yüksek yoğunlukta oksijen uygulanmasının akciğerlere hasar verdiği bilinmekle beraber bunun güvenli seviyesinin ve maruziyet süresinin ne olduğu halen açık değildir. Hücresel hasar, sitotoksik reaktif oksijen metabolitlerinin (örneğin; süperoksit serbest radikali, hidrojen peroksit, hidroksil serbest radikali ve tek atomlu oksijen) aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır. Üretilen miktar yenidoğanın olgunlaşmamış antioksidan sisteminin temizleyeceğinden fazladır (Şekil 2).



ROS: Reaktif oksijen türleri

Şekil 2. Oksidatif stresin oluşumu

Erkendoğan bebeklerde besinsel antioksidanların (vitamin A ve E, demir, bakır, selenyum, çinko) yeterince alınmaması veya olgunlaşmamış antioksidan enzim sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz) nedeniyle oksidan ajanlara karşı savunma yetersizdir.⁵⁹ Erkendoğan bebeklerin kordon kanında zamanında doğan bebeklere göre katalaz, glutatyon peroksidaz, Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi daha düşük bulunmuştur.⁶⁰ Antioksidan savunmanın genetik çeşitliliği ile ilgili kanıtlar vardır. Örneğin; daha az etkin glutatyon-S-transferaz-P1 izoformuna sahip bebeklerde oksijen toksisitesine ve BPD gelişimine yatkınlık olduğu gösterilmiştir.⁶¹

Erkendoğan bebeklerde yüksek yoğunlukta oksijenle karşılaşma sonucunda reaktif oksijen/reaktif nitrojen ürünlerinin arttığı, proteinaz/antiproteinaz dengesinin bozulduğu, yangı ve stres cevabının ortaya çıktığı, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının bozulduğu bilinmektedir.⁴⁷ Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile paralel olarak akciğer endotel ve epitel hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir.⁶² Hiperoksi distal hava yollarında dallanmayı baskılayarak gelişimin duraklamasına neden olmaktadır.⁶³ Hiperoksinin yakın zamanda gösterilmiş hasar mekanizmaları arasında; nötrofil aktivasyonuna neden olması, bu yolla endotel ve epitel hücrelerinde hasar yapması,⁶⁴ TGF- α ⁶⁵ ve lökotrien⁶⁶ düzeylerini arttırması, hücre çekirdeğinde yangı, koagülasyon ve fibrinoliz yapması, hücre döngüsü genleri üzerinde olumsuz etkisinin olması⁶⁷ ve endotelin-1 düzeylerini arttırması⁶⁸ sayılabilir. Enfeksiyon, yangı, proinflamatuvar sitokinlerde artış ve bu sitokinlerden reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, oksidan strese katkıda bulunur. Oksidan stres ile proteinlerin oksidasyonu sonucu bunların ürünleri olan karboniller, karbonhidratların oksidasyonu sonucu oluşan hidrokarbonlar, lipid oksidasyonu sonucu oluşan plazma aldehit ve malondialdehitler ortaya çıkar. Bütün bunların etkisiyle hücresel yapılarda zedelenme ve hücre ölümü gelişir. Oksidan stresin akciğerlerdeki patolojik etkileri, matriks metalloproteinleri aracılığı ile fibrozis gelişmesi şeklide olup klinik sonucu BPD'dir.⁶⁹

Antioksidan mekanizmaların olgunlaşmamış olması ile birlikte BPD'li erkendoğan bebeklerde antioksidan sistemleri güçlendirici bazı düzenlemeler de vardır. Gebelik yaşı 25-30 hafta arası olan 44 erkendoğan bebekte yapılan çalışmada, yaşamın ilk haftası boyunca Cu/Zn SOD seviyesi izlenmiş ve altıncı günde enzim düzeyinin BPD gelişenlerde BPD gelişmeyenlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.⁷⁰

2.4.4. Enfeksiyonlar

Doğum öncesi ve sonrası gelişen enfeksiyonlar BPD ile ilişkilidir. Avustralya’da ortalama gebelik yaşı 27 hafta 4 gün olan 798 erkendoğan bebeklerde yapılan çalışmada; yenidoğan sepsisinin BPD riskini arttırdığı, kandidemisi olan bebeklerde bu riskin en yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır.⁷¹ BPD gelişim riski, sepsisin semptomatik PDA ile birlikteliğinde artış göstermektedir. Başlangıçta solunum sıkıntısı olmayan veya hafif olan 119 ADDA’lı bebekte yapılan çalışmada; sepsis ile PDA birlikteliğinde BPD gelişmesi, sadece PDA’sı veya sadece sepsisi olanlara göre belirgin yüksek bulunmuştur.

Doğum öncesi gelişen enfeksiyonlar da BPD gelişimine katkıda bulunurlar. BPD gelişen bebeklerin amniyon sıvısında proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , IL-8) yoğunluğu artmış olarak bulunmuştur.⁷² Özellikle Ureaplasma urealyticum enfeksiyonlarında yangısal cevabın bozulduğu ve bunun akciğer gelişimini bozarak BPD gelişimine neden olduğu izlenmiştir.^{73,74} Ayrıca, ağır koryoamniyonitli annelerin erkendoğan bebeklerinde sürfaktan yanıtının da bozuk olduğu izlenmiştir. Annesinde koryoamniyonit olmayıp sürfaktan verilenlere göre koryoamniyoniti olan annelerin sürfaktan verilen bebeklerinde BPD riskinin artmış olarak bulunması bu azalmış sürfaktan cevabından dolayı olabilir.⁷⁵ Bunun aksini idda eden çalışmalar da bulunmaktadır. Yukarıda yenidoğan sepsisinde BPD riskinin artmış bulunduğu Avustralya’dan yapılan çalışmada, koryoamniyonitin azalmış BPD riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır.⁷¹

2.4.5. Yangı

BPD gelişen bebeklerin kanında BPD gelişmeyenlere göre proinflamatuvar sitokinler ve kemotaktik faktörler daha yüksek bulunmuştur.^{72,76-78} Bu faktörlerin varlığı; kompleman aktivasyonu, artmış damarsal geçirgenlik, protein sızıntısı, nötrofillerin interstisyel ve alveoler mesafeye göçü ile ilişkilidir.⁷⁹ Aktive nötrofillerden reaktif oksijen köklerinin, elastazın ve kollojenazın salınımı akciğer hasarı ile sonuçlanır. Proinflamatuvar sitokinlerin (makrofaj inflamatuvar protein-1, IL-8 gibi) üretiminin devam etmesi, karşıt düzenleyici sitokinlerin (IL-10, IL-17 gibi) azalması sonucu düzensiz ve süregen bir yangı olur.¹⁴ Bazı bebeklerde BPD gelişimi, olasılıkla koryoamniyonitten dolayı, proinflamatuvar sitokinlere doğum öncesi dönemde maruz

kalınması sonucu doğumdan önce başlayabilir. Ağır koryoamniyoniti olan anne bebeklerinin kordon kanında proinflatuar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 artmış olup bu artış ile BPD gelişimi arasında ilişki vardır.⁸⁰ Son zamanlardaki çalışmalar bu yangısal maddelerin hücre sinyali yolağında değişimler yapılarak, akciğer dallanmasını ve bunun düzgün şeklini geliştirebilmeye yönelmiştir. Fibroblast büyüme faktörü-10 (Fibroblast Growth Factor-10, FGF-10) akciğer gelişiminde çok önemli olan mezenkimal büyüme faktörü olup hava yolu gelişimi ve dallanmasını uyarır. Nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), BPD gelişimi ile ilgili bazı genlerin ekspresyonundan sorumludur. Hücrel stres ile NF- $\kappa\beta$ 'nin aktive olması sonucu fetal akciğer mezenşiminde FGF-10'un normal ekspresyonu ve akciğer şekillenmesi baskılanır.⁸¹ Koryoamniyonitin olmadığı mekanik ventilatöre bağlı akciğer hasarında da sitokin aracılı bir yıkım vardır ve bu konağın savunma mekanizmasına göre düzenlenir. BPD gelişim riski olan RDS'li bebeklerin trakeal aspiratlarında artmış sitokin seviyeleri olup özellikle IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve interferon- γ (IFN- γ) seviyelerinde artış, IL-17 seviyesinde azalma BPD gelişimi için öngörüselle değere sahiptir.⁸²

Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1, TGF- β 1) sinyalindeki değişikliklerin BPD gelişimi ile ilişkisi gösterilmiştir. Bronkoalveolar lavaj sıvısında TGF- β 1'in artmış olması BPD gelişimi ve oksijen desteği gereksiniminin devamı için öngörüselle değere sahiptir. Yenidoğan sıçanların akciğerine TGF- β 1 geni verilmesi ile BPD benzeri histopatolojik değişimler izlenmiştir. Son zamanlardaki çalışmalar amniyotik sıvıda TGF- β 1 seviyesi, koryoamniyonit ve fetal akciğer hasarı ilişkisine odaklanmıştır.⁸³

2.4.6. Genetik

Genetik yatkınlık BPD gelişimini etkileyebilir. Gebelik yaşı 30 haftadan küçük olan tek ve çift yumurta ikizlerinin karşılaştırıldığı çalışmada; tek yumurta ikizlerinden birinde BPD varlığında diğesinde de olma olasılığı çift yumurta ikizlerine göre yüksek bulunmuştur.⁸⁴

Tümör nekroz faktörü (TNF- α), Toll-like reseptör-10 (TLR-10) ve VEGF'de genetik çeşitlilik BPD gelişiminde rol oynamaktadır.⁸⁵ Sürfaktan proteinleri, sürfaktan aktivitesini ve doğal konak direncini düzenlemekte önemli olup, sürfaktan proteinlerindeki genetik farklılıkların da BPD gelişimine katkısı vardır. Son

zamanlardaki çalışmalarda BPD ile ilişkili olan, sürfaktan proteini-B (SP-B) ailesinin sorumlu 10 haplotipi tanımlanmıştır.

2.4.7. Geç Sürfaktan Eksikliği

Doğum sonrası sürfaktan eksikliğinin geç dönemde de devam etmesi veya düzelmesinde gecikme olması BPD patogenezinde rol oynar. Gebelik yaşı 23-30 hafta olan, ventilatöre bağımlı 68 erkendoğan bebekte yapılan bir çalışmada alınan trakeal aspirat örneklerinin % 75'inde normalin altında olan düşük yüzey gerilimi saptanmıştır.⁸⁶ Bu örneklerde sürfaktan proteini A, B, C sırasıyla % 50, % 80, % 72 oranında azalmış bulunmuştur. Ayrıca düşük yüzey gerilimi ile enfeksiyon gelişim sıklığı ve solunumsal kötüleşme atakları arasında da ilişki izlenmiştir. Bu sonuçlar sürekli solunum desteği gereken erkendoğan bebeklerde, kliniğe de yansıyan, geçici sürfaktan fonksiyon bozukluğu veya eksikliği olduğunu düşündürmüştür.

2.5. Klinik Bulgular

Sürfaktan ve doğum öncesi steroid uygulamaları sonrası BPD kliniği ve patofizyolojisi değişmiştir. BPD gelişen bebeklerin üçte ikisi 1000 gram altı ve 28. gebelik haftasından küçük bebekler olup yaşamın ilk günlerinde düşük basınç ve orta derecede oksijen ihtiyacı gösterirler. Daha sonra bu bulgular düzelir, birkaç gün veya haftalık bir “balayı” döneminden sonra klinik durum bozulmaya, daha yoğun mekanik ventilasyon ve oksijen ihtiyacı gelişmeye başlar. Eşlik eden bakteriyel enfeksiyonların veya PDA'nın varlığı süreci hızlandırır. Solunum yolu salgılarında artış, buna bağlı karbondioksit birikimi vardır. Fizik muayene bulguları değişkendir. Bebekler genelde takipneiktir, akciğer ödemi ve atelektazilerin yaygınlığına göre hafiften ağıra değişebilen çekilmeler, krepitan raller vardır. Skar gelişimi ve salgılarda artış gibi nedenlerle hava yolu daralması olanlarda aralıklı ekspiratuar hışıltı duyulur. Apne atakları, beslenme güçlüğü ve kilo alımında yavaşlama sıklıkla vardır.

BPD bir çok risk faktörü (erken doğum, mekanik ventilasyon, oksijen toksisitesi, sepsis, PDA) ile ilişkilidir. Risk faktörleri 30 hafta ve üzeri veya doğum ağırlığı 1250 gramdan büyük olanlarda sık değildir.^{14,18} ELGANS çalışması kapsamında, 28. gebelik haftasından küçük 1340 bebekte doğum sonrası ilk iki hafta içinde ortaya çıkan üç

solunumsal kliniğin BPD gelişimi ile ilgisi üzerinde durulmuştur:

- Sürekli % 25'ten fazla oksijen gereksinimi olan, dirençli akciğer işlev bozukluğu olarak tanımlanan bebekler grubun % 40'ı olup bunların üçte ikisinde BPD gelişmiştir,
- Yaşamın ilk 14 gününde % 25'ten çok oksijen ihtiyacı olan, akciğer işlevlerinde bozukluk olarak tanımlanan bebekler grubun % 40'ı olup bunların yarısında BPD gelişmiştir,
- Sürekli % 25'ten çok oksijen ihtiyacı olmayan, çok az akciğer işlev bozukluğu olarak tanımlananlar ise tüm grubun % 20'si olup % 17'sinde BPD gelişmiştir.⁴¹

2.6. Radyolojik Bulgular

BPD ilk kez Northway tarafından radyolojik bozukluklar olarak tanımlanmıştır. Northway hastalığın ağırlık derecesine göre dört radyolojik evre tarif etmiştir:

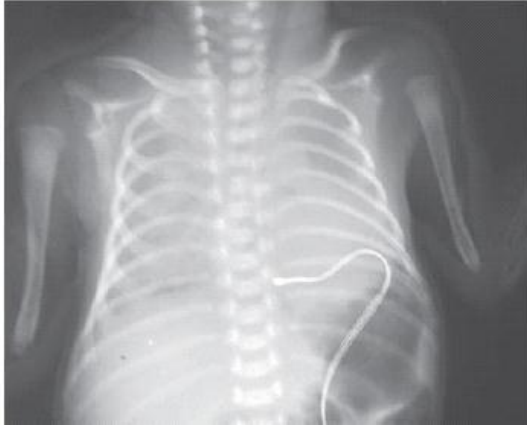
Evre I (1-3 gün): RDS'ye benzer bulgular; hava bronkogramları ve retikülogranüler görünüm vardır.

Evre II (4-10 gün): Parankimde opasiteler, akciğer hacminde azalma. Yaygın akciğer ödemi veya sıvı yüklenmesinden ayırdedilemez.

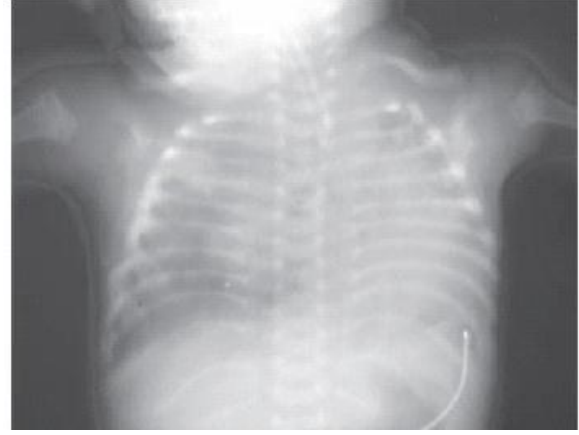
Evre III (11-30 gün): Aşırı havalanma ve kistik alanlarla atelektatik alanların birlikteliği vardır.

Evre IV (1. aydan sonra): Heterojen görünüm vardır. Yer yer aşırı havalanan bölgeler ve kistik alanlar, yer yer opasiteler, düzensiz fibröz bantlar ve kalpte büyüme bulunur.

BPD gelişmekte iken akciğer grafisinde yaygın puslu görünüm baskındır. Bu, atelektazi, yangı ve/veya akciğer ödemi yansıtır. Atelektatik alanlar yanında, hava yolunun salgılar veya epitel artıkları ile tıkanması sonucu hava tuzaklanması olan alanlar (Şekil 3 ve 4) bulunur.⁸⁷



Şekil 3. Hafif bronkopulmoner displazi (Yaygın puslu görünüm)



Şekil 4. Ağır bronkopulmoner displazi (Aşırı havalanma ve heterojen görünüm)

BPD gelişen bebeklerin akciğer grafisinde aşırı havalanma vardır. Çizgi şeklindeki dansitelerin veya kistik alanların izlenmesi fibrotik değişimleri yansıtır. Akut alevlenme dönemlerinde akciğer ödemi izlenir.

2.7. Klinik Seyir ve Prognoz

Bir çok bebek 2-4 ayda iyileşir. Solunumsal işlevler düzeldikçe CPAP'ten oda havası ile yeterli oksijenasyon sağlanana kadar yardımcı yapay solunum gerekmeden sadece oksijen desteğine geçilir. Ağır BPD'li bazı bebekler uzun süre ventilatöre bağlı kalır. Genelde bu süre 4-6 haftadan sonra klinikte akut bozulmayı izleyen yeniden ventilasyon ihtiyacı gelişimi şeklinde olur. Bu ağır etkilenen bebeklerde pulmoner hipertansiyon ve kor pulmonale gelişir. Artmış akciğer damar direnci, akciğerlerin lenfatik direnancının bozulmasına ve interstisyel ödeme neden olur. Bazı olgularda akciğer damarları ve sistemik damarlar arasında anastomoz gelişir ve pulmoner hipertansiyon daha da artar.⁸⁸ Hastalığın kısa ve uzun dönemde istenmeyen sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.⁴⁸

Tablo 4. Bronkopulmoner displazide uzun ve kısa dönem sonuçlar

Yenidoğan dönemi	Uzun dönem
Uzamış mekanik ventilasyon ve oksijen gereksinimi	Geç dönemde artmış ölüm oranları
Hava yolu aşırı duyarlılığı	Bozulmuş kalp-akciğer işlevleri
Pulmoner hipertansiyon	Azalmış egzersiz toleransı
Sistemik hipertansiyon	Nörogelişimsel gerilik
Hastanede kalış süresinde uzama	Sık hastaneye yatışlar
Büyüme geriliği	Büyüme geriliği

2.8. Bronkopulmoner Displazinin Önlenmesi ve Tedavisi

BPD tanıldıktan sonraki tıbbi bakımlar solunum tedavilerindeki akciğer hasarını en aza indirmeye, beslenmeyi ve büyümeyi en iyi hale getirmeye odaklanmıştır. BPD'nin ciddi ve uzun dönemli bir sağlık sorunu olmasından dolayı hastalığın tedavisinden çok önlenmesi çalışmaları önem kazanmıştır. BPD sıklıkla RDS'den dolayı akciğerlerin erken dönemde hasarlanmasıyla ilişkili olduğundan RDS'nin önlenmesi veya hafifletilmesi için çabalanmıştır. PDA varlığı BPD gelişimine katkıda bulunduğu için PDA tedavisine, apne ve prematürite gibi direk akciğer kaynaklı olmayan durumların BPD'ye neden olduğunun bilinmesinden dolayı erken doğumun önlenmesine odaklanılmıştır. BPD patogenezinin sorumlu faktörler çok çeşitli olduğundan BPD'yi önlemeye yönelik çalışmalar bir çok alanı ilgilendirir.^{48,89}

2.8.1. Doğum Öncesi Tedaviler: Doğum Öncesi Steroid Kullanımı

Erken doğum riski olduğunda gebeye glukokortikoid uygulamanın bebekte RDS'yi, dolayısıyla ventrikül içi kanama (VİK) ve ölümü azalttığı gösterilmiştir. Doğum öncesi dönemde steroid alan annelerin erkendoğan bebeklerinde, BPD için önemli risk faktörü olan mekanik ventilasyona ve oksijene ihtiyaç daha az olmaktadır. Yedi gün içinde erken doğum riski olan, membranları açılmamış, 24-34 gebelik haftasındaki gebelere steroid uygulanır.⁴⁸ Doğum öncesi steroid tedavisi ile erkendoğan bebeklerin yaşam şansının artmış olması sonucu ölümlerde azalma olmuş ancak bu tedavi BPD sıklığını azaltmamıştır.

2.8.2. Zamanından Önce Doğumun Erken Sorunlarının ve Hastalıklarının Önlenmesi

2.8.2.1. Sürfaktan Tedavisi

Sürfaktan ürünlerindeki gelişmeler, bu ürünlerin kullanımı ile BPD sıklığının azalacağı umudunu doğurmuştur. Sürfaktan tedavisi özellikle doğumdan hemen sonra koruyucu olarak verildiğinde, RDS tanımlandıktan sonraki uygulamaya kıyasla ölüm sıklığını ve pnömotoraks gelişimini azalttığı için, akciğer hasarı gelişimini azaltmaktadır.⁹⁰ Ancak bu uygulama BPD sıklığında azalma sağlamamıştır.^{91,92}

Orijinal sürfaktan çalışmalarında iki sürfaktan tedavi yöntemi tanımlanmıştır.

Birinci yöntem; kendiliğinden soluyabilen bebeklere sürfaktan verip mekanik ventilasyon uygulanması zorunlu değilse ekstübe etmek (entübasyon, sürfaktan uygulama, ekstübasyon) şeklindedir.⁹³ Üç çalışmada bu yöntemin yararlı olduğu gösterilmiştir.⁹⁴⁻⁹⁶ Ancak bu çalışmaların hiçbirinde BPD'nin istatistiksel olarak azaldığı izlenmemiştir. Bir Cochrane toplu çözümlemesinde doğumdan kısa süre sonra verilen sürfaktan tedavisinin geç uygulamaya göre hava kaçağı ve BPD'yi (BPD 28. günde oksijen gereksiniminin devam etmesi olarak tanımlanmış) azalttığı izlenmiştir.⁹⁷

Sürfaktan uygulamadaki ikinci yöntem; yaşamın ilk haftasında ikincil nedenlere bağlı gelişen sürfaktan işlev bozukluğu oluşunca yapılan tedavidir. Bu uygulamanın yapıldığı bebeklerde BPD riski yüksektir. Bu yöntem ile oksijen ihtiyacında azalma sağlanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilememiştir. Ayrıca gruplar arasında ölüm ve BPD gelişimi açısından da fark izlenmemiştir.⁸⁶

Sonuçta; sürfaktan tedavisi RDS'den dolayı olan hava kaçağı ve ölümleri azaltmakta ancak BPD sıklığında değişiklik yapmamaktadır. Erken sürfaktan tedavisi ile RDS tanımlandıktan sonra yapılan sürfaktan tedavisi arasında BPD'yi önleme açısından farklılık olduğuna dair yeterli kanıt yoktur.

2.8.2.2. Patent Duktus Arteriyozusunun Kapatılması

Erkendoğan bebeklerde PDA sık görülür ve BPD'yi de kapsayan yenidoğan dönemi sorunlarıyla ilişkilidir.⁴² Sistemik dolaşımdan pulmoner dolaşıma kan akımının artması ile akciğer genişleyebilme yeteneğinde azalma, ventilasyon gereksiniminde artma, ventilatör aracılı akciğer hasarı ve dolayısıyla BPD gelişimi söz konusudur.^{98,99} PDA ve BPD arasında ilişki olmasına rağmen PDA'nın ilaçla veya cerrahi olarak düzeltilmesinin BPD sıklığını azaltmadığı izlenmiştir.

2.8.2.3. Prematüre Apnesinde Kafein Kullanımı

Bir metilksantin olan kafein prematüre apnesi tedavisinde kullanılmaktadır. Büyük randomize kontrollü çalışmalarda 500-1250 gram arasında olan erkendoğan bebeklerde kafein tedavisinin ikincil sonuçları kafein kullanımının BPD sıklığını azaltmasına yönelik olup kafein grubundaki bebeklerde BPD sıklığı azalmış olarak saptanmıştır (kafein grubunda % 36, plasebo grubunda % 47, $p<0,001$) (100). Kafeinin BPD'yi azaltmadaki mekanizması belirsizdir. Kafein verilen bebeklerde pozitif hava

yolu basıncı uygulama süresi kısalmıştır.¹⁰¹ Kafein mekanik ventilasyon süresini kısaltarak ventilatör aracılı akciğer hasarını azaltıyor olabilir.

2.8.3. Anti-inflamatuvar Tedaviler

2.8.3.1. Sistemik Kortikosteroidler: Dekzametazon ve Hidrokortizon

Kronik akciğer hastalığı tedavisinde en çok kullanılan anti-inflamatuvar ilaç kortikosteroidlerdir. Kortikosteroidler akciğer işlevlerini ve akciğer hastalığını birkaç mekanizmayla etkilemektedir. Fetal maruziyet sürfaktan sentezini arttırmakta ve akciğerlerin epitelyal farklılaşmasını sağlamaktadır. BPD'deki düzenleyici etki yangıyı azaltma şeklindedir. Kortikosteroidler ayrıca akciğer hasarı sonrası fibronektin üretimini önleyerek onarımı düzenlemekte, ardından gelen fibrozisi azaltmakta ve retinol miktarında artışa neden olmaktadır. Kısa süreli dekzametazon tedavisinin ekstübasyonu hızlandırdığı ve kronik akciğer hastalığı (KAH) olduğu kesinleşmiş bebeklerde geçici bir düzelme sağladığı gösterilmiştir. Ancak, uzun dönemde maliyet ve ölüm üzerine düzeltici etki sağlanmamıştır. Ayrıca birçok çalışmada dekzametazon tedavisi ile bedensel büyümede ve beyin büyümesinde duraklama olduğu bildirilmiştir.

Son 25 yıldır yapılan klinik çalışmalarda kortikosteroidlerin BPD'yi önleme ve tedavi etmedeki rolü incelenmektedir. Çoğunda, akciğer işlevlerinde kısa dönemde düzelme gösterilmiştir. İki Cochrane toplu çözümlemesinde sistemik kortikosteroidlerin BPD tedavisindeki sonuçları toparlanmıştır. Erken tedavi doğum sonrası sekizinci günden önce başlanan, geç tedavi yedinci günden sonra başlanan tedavi olarak tanımlanmıştır.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Erken tedavi ile ilgili 3740 bebeğin alındığı, 20'sinde dekzametazon ve sekizinde hidrokortizon kullanılan 28 çalışmada, erken tedavinin faydaları arasında 28. gün ve dölleme sonrası 36. haftada BPD gelişmesi riskinde azalma olduğu, ölüm sıklığında değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Çalışmaların 20'sinde kortikosteroidlerin nörogelişimsel sonuçlara etkisi incelenmiş ve beyin felci riskinde artış gösterilmiştir. Erken tedavide motor işlevlerde bozulma riski olduğu günümüzde bilinmektedir. Geç tedavi ile ilgili 1345 bebeğin alındığı 19 çalışmada, 28. günde ve dölleme sonrası 36. haftada BPD gelişmesi riskinde ve ölüm sıklığında azalma izlenmiştir.

Dekzametazonun yan etkilerinden dolayı BPD tedavisinde hidrokortizonun seçenek olması üzerinde yoğunlaşmıştır. Cochrane toplu çözümlemelerinde erken

kortikosteroid tedavisinde hidrokortizonun kullanıldığı sekiz çalışmanın sonuçlarına göre 28. günde veya döllenme sonrası 36. haftada BPD sıklığında küçük bir azalma izlenmiş ancak gastrointestinal delinme gelişiminde belirgin artış saptanmıştır. Erken dönemde uygulanan hidrokortizonun nörogelişimsel bozukluklarla ilişkisi saptanmamıştır.

Sonuçta; nisbeten düşük riske sahip erkendoğanlarda BPD'yi önlemek için kortikosteroid kullanımını destekleyen kanıtlar yoktur. Amerikan Pediatri Akademisi'nin (American Academy of Pediatrics, AAP) önerileri, nörogelişimsel bozulma olmadan BPD'yi azaltacağımız gruplarda steroid kullanımı yönündedir.¹⁰⁵ Ancak bu grubu tanımlayan ölçütler henüz belli değildir. BPD'yi önlemek için steroid kullanımını destekleyen kanıtlanmış bir yöntem de henüz yoktur.

2.8.3.2. İn hale Kortikosteroidler

Sistemik tedaviye ek olarak kortikosteroidler inhaler veya daha yaygın olarak nebulizasyon ile verilebilir. Cochrane toplu çözümlerinde bu konu ile ilgili 11 çalışma incelenmiştir. Ventilatör bağımlı olup doğum sonrası yaşı iki haftadan küçük olan bebeklere erken inhale kortikosteroid başlanmış ve BPD gelişim sıklığı değerlendirilmiştir.¹⁰⁶ İn hale kortikosteroidlerin BPD'ye veya ölüm sıklığına etkisi olmamıştır. Mekanik ventile edilmeyen bebeklerde inhale kortikosteroid kullanımının BPD'yi önlemedeki etkisi ise henüz değerlendirilmemiştir.

Sonuçta; inhale kortikosteroidlerin BPD gelişimini önlediğini destekleyen kanıt yoktur.

2.8.3.3. İn hale Nitrik Oksit

İn hale nitrik oksit (iNO), zamanında veya zamanına yakın doğan, çeşitli nedenlerle (mekonyum aspirasyon sendromu, sepsis, idiopatik persistan pulmoner hipertansiyon) solunum yetmezliği gelişen bebeklerde oksijenlenmeyi düzeltmektedir.¹⁰⁷

iNO'nun BPD'yi önlemede açık bir rolü olduğunu destekleyen kanıt yoktur. Risk grubu tanımlamasına göre bazı durumlarda faydalı olabilir ama henüz kullanılacak grubun, risklerin ve yaşın ne olduğu tanımlanmamıştır.

2.8.4. Serbest Oksijen Kökleri ve Antioksidanlar

2.8.4.1. Serbest Oksijen Kökleri

Serbest oksijen kökleri dış orbitalarında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllerdir. Oksijenden tek elektron indirgenmesi ile oluşan bu moleküller; iskeminin yeniden kanlanma döneminde, hiperoksik hasarda, doku yangısında oksidan yıkım yaparak hastalıkların patogenezinde yer alırlar.

Serbest kökler hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki eder. Süperoksit kökü (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^-) hücrenin tüm yapılarında lipid peroksidasyonuna neden olur, böylece hücre zarı geçirgenliği artar ve hücre yıkımı olur.

Süperoksit kökü, hidroksil kökü ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen kökleri fizyolojik durumlarda ve oksidatif reaksiyonlarda üretilirler. Bu köklere karşı mücadele eden antioksidan sistemler içinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve ekzojen antioksidan olan E ve C vitaminleri yer alır. Yenidoğanlarda özellikle de antioksidan sistemleri henüz gelişmemiş olan erkendoğanlarda oksidatif hasar, prematüre retinopatisi (PR), nekrotizan enterokolit (NEK), BPD, VİK ve hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) gibi hiperoksi ve/veya iskemi-yeniden kanlanma aracılı hastalıklarda önemli rol oynar.^{69,108-110} Oksidanların artışı ve antioksidanların azlığı hasara neden olmaya başlar. Hücresel savunma mekanizmasında ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen köklerinin oluşumuna “oksidatif stres”denir. Oksidatif stresi önlemede endojen ve ekzojen antioksidanlar görev yapmaktadır.

2.8.5. Beslenme

Enerji kaynaklarının niteliksel ve niceliksel eksikliği erkendoğan bebekte akciğer iyileşmesinde gecikmeye neden olarak BPD'yi olumsuz yönde etkiler. Erkendoğan bebekler zamanında doğan bebeklere göre düşük glikojen ve yağ deposuna sahip olduğundan besinsel eksikliklerden daha kolay etkilenir. Solunumsal hastalık sürecinde düşük kalori alımı, solunum kaslarında güçsüzlüğe ve mekanik ventilatörde daha uzun süre kalmaya neden olur.¹¹¹ Bir vaka-kontrollü çalışmada BPD gelişen bebeklerdeki temel enerji alımının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır.¹¹² 1500 gram altı 125 erkendoğan bebeğin alındığı bir çalışmada standart damar yoluyla beslenme uygulanan (en fazla 2 gr/kg/gün lipid, 2,5 gr/kg/gün aminoasit ve % 10

dekstroz sıvısı ile standart enteral beslenme artışları) ve yoğun beslenme uygulanan (en fazla 3,5 gr/kg/gün lipid, 3,5 gr/kg/gün aminoasit ve % 15 dekstroz sıvısı ile yoğun ağız yoluyla beslenme programı) gruplar karşılaştırılmıştır. Yoğun beslenme grubunda kilo artışı ve hızlı büyüme izlenmiş ancak solunumsal sonuçlarda (mekanik ventilasyon süresi, BPD gelişimi, 36. haftaya ulaştığında oksijen ihtiyacı) gruplar arasında fark izlenmemiştir.¹¹³

2.8.5.1. A Vitamini

A vitamini türevlerinin yağda çözünenleri retinoid olarak adlandırılır. Retinoidler akciğer hastalıklarının seyrinde önemli bir role sahiptir. Bu ürünler akciğer epiteliyal hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasında, akciğer hasarının onarımında önemlidir.^{4,5} Hayvanlarda, A vitamini eksikliği varlığında hiperoksiye uzun süre maruz kalındığında akciğer gelişiminde bozulmalar izlenmiştir. Erkendoğan bebeklerde doğumda A vitamini seviyesi düşüktür ve bu durum artmış BPD riski ile ilişkilidir.¹¹⁴ Bu nedenle A vitamini desteği BPD'yi önleme stratejilerinden biri olarak gelişmiştir.

2.8.6. Sıvı Kısıtlaması ve Diüretik Tedavi

Akciğerlerde aşırı sıvı olması akciğer mekaniklerini bozarak gaz değişimini önler, bu da artmış oksijen ve ventilatör desteğine neden olur. Bu mekanizmalardan dolayı, aşırı akciğer sıvısının varlığı BPD gelişiminde rol oynuyor olabilir. Yaşamın ilk günlerinde sıvı kısıtlanması BPD gelişimini önlemeye yardımcıdır. Bu olasılık 1382 ADDA'lı bebekte yapılan kohort çalışmada gösterilmiştir.^{115,116}

2.8.7. Bronkopulmoner Displaziye Önlemede Koruyucu Ventilatör Yöntemleri

2.8.7.1. İzin Verilebilir Karbondioksit Yüksekliği Uygulanması

Mekanik ventilasyon bazı erkendoğanlar için yaşamsaldır, akciğer hasarı ve BPD için ise risk faktörüdür. Geçmişe dönük çalışmalar yaşamın ilk günlerinde yüksek karbondioksit (CO₂) seviyesinin düşük BPD riski ile ilişkisini göstermiştir.⁵²

2.8.7.2. Yüksek Frekanslı Ventilasyon

Bazı klinisyenler yüksek frekanslı ventilasyonun (High Frequency Ventilation,

HFV) bazı tiplerini geleneksel mekanik ventilasyona tercih etmektedir. Seçilen bebeklerde HFV ile daha az akciğer hasarı olduğu izlenmiştir.^{117,118} Ancak BPD'yi önlemede HFV'nin kullanımını destekleyen kesin kanıtlar henüz yoktur.

2.8.7.3. Nazal Devamlı Pozitif Havayolu Basıncı

Nazal devamlı pozitif havayolu basıncı (Continuous Positive Airway Pressure, CPAP) kullanımı bazı bebeklerde mekanik ventilasyon uygulamadan kaçınmada başarılı bir yöntem olup BPD riskini azaltmada yararlı olduğu düşünülmektedir.^{119,120}

Gözlemsel bir kohort çalışmada erken CPAP kullanımı ile BPD riskinde azalma izlenmiştir.⁵⁸ Ancak rutin CPAP kullanımının mekanik ventilasyondan kaçınma ve BPD'yi önlemede etkin olduğunu destekleyen randomize kontrollü çalışmalarla desteklenmiş kesin kanıtlar yoktur.

2.8.7.4. Hedef Satürasyon Belirleme

BPD patogenezinde oksijenin zararlı etkisinin rolü iyi bilinmektedir. Özellikle DDA'lı (düşük doğum ağırlıklı) ve ÇDDA'lı bebeklerde hedef oksijen satürasyon aralığının ne olduğu ise henüz açık değildir. Yapılan bir çalışmada doğum ağırlığı 1250 gram altında ve 29 haftadan küçük bebeklerde % 88-92, doğum ağırlığı 1250 gram ve üzerinde olup 29 haftadan büyük olan bebeklerde % 88-95 aralığının güvenli olabileceği bildirilmiştir. paO_2 'yi (kısmi arteriyel oksijen basıncı) 40-80 mmHg olarak sağlayabilen hedef satürasyon ölçümünün % 90 civarında olduğu bildirilmiş ve bu düzey önerilmiştir.¹²¹

2.8.8. Diğer Tedaviler

2.8.8.1. H₂ Resptör Blokerleri: Simetidin

Simetidin sitokrom P450'yi baskılayabilen bir H₂ reseptör blokeridir. Akciğer hasarı sürecinde sitokrom P450'nin artmış düzenlenmesinin olduğunun izlenmesi bunun baskılanmasının koruyucu olabileceğini düşündürmüştür.¹²² Ancak BPD'yi önlemede simetidin'in etkisini destekleyen kanıt yoktur.

2.8.8.2. Üreoplazma Enfeksiyonlarının Makrolidlerle Tedavisi

Solunum yollarında Üreoplazma kolonizasyonu ile BPD gelişimi arasında ilişki olmakla birlikte bu nedensel ilişkinin kolonizasyonla mı, hastalıkla mı olduğu açık değildir. Tedavi, kolonizasyonu önleyerek BPD'yi azaltıyor olabilir.¹²³⁻¹²⁵ Ancak Üreoplazmanın solunum yollarındaki kolonizasyonunun tedavi edilmesinin BPD'yi önlediğine dair kanıtlar yoktur. Bununla birlikte kolonizasyon ile BPD arasında güçlü bir ilişki olduğundan kolonizasyonu önleme veya tedavi etmede yaklaşımın ne olacağı ile ilgili geniş çalışmalar yapılmalıdır.

2.8.8.3. Yoğun Fototerapi

Bilirubin, oksijen ve peroksit köklerinin etkin bir temizleyicisidir.¹²⁶ BPD patogeneğinde oksidatif hasarın kritik rolü olduğundan, bilirubin akciğerde koruyucu bir etkiye sahip olabileceği ve BPD'yi azaltabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda umulanın aksine yoğun fototerapi alan bebeklerde BPD oranı daha düşük bulunmuştur.¹²⁷ 1000 gram altındaki bebeklerde yoğun fototerapi olasılıkla ikincil faydalarından dolayı BPD'yi azaltıyor gibi görünmektedir.

2.9. Bronkopulmoner Displazi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Deneysel Akciğer Hasar Modelleri

Bronkopulmoner displazi (BPD) ile ilgili çalışmalarda sıklıkla hiperoksi aracılı akciğer hasar modeli kullanılmakla birlikte hipoksi, bleomisin, lipopolisakkarit ve mekanik ventilasyon kullanılarak oluşturulan modellerde de yapılmış çalışmalar vardır.

Doğum sonrası ılımlı hipoksi (% 16 oksijen) yapılan, endotelial nitrikoksit sentaz enzimi eksikliği olan sıçan yavrularında alveolar ve damarsal büyümenin bozulduğu izlenmiştir. Bu durumun olasılıkla VEGF reseptör-2 sinyalinde bozulma sonucu olmaktadır.¹²⁸ Yayınlarında endotelial nitrikoksit sentaz enzimi eksikliği olan sıçan yavrularında bu model kullanılmış olup bu modelin kullanıldığı normal sıçanlarla yapılan çalışmaya rastlanmamıştır.

Bleomisinin alveolar ve damarsal büyümeyi bozduğu, pulmoner hipertansiyon gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bleomisin aracılı akciğer hasar modellerinde BPD'ye benzer şekilde erken dönemde yangı ve geç dönemde fibrozis izlenmektedir.

Bleomisin distal akciğerlerde septasyonu azaltarak akciğer hacmini azaltmaktadır. Bleomisinin sistemik verilmesi ile sıçanların akciğerinde alveol sayısında azalma, hava alanlarında genişleme ve damar yoğunluğunda azalma izlenmiştir. Yapılan çalışmalarda trakeal yolla bleomisin verilmesi sonucu bronkoalveolar lavaj sıvısında makrofaj, nötrofil ve lenfosit sayısını arttırmıştır. Ayrıca akciğerlerde yangısal ve mitojenik mediyatörler (endotelin-1, makrofaj katyonik protein-1 ve tümör nekroz faktör- α), akciğer dokusundaki hidrokisiprolin içeriği ve akciğerlerin profibrotik belirteçleri bir hafta sonunda belirgin şekilde artmıştır. Sistemik bleomisin verilmesi ile bu etkilerin daha az olduğu trakeal yolla uygulamanın model oluşturmada daha uygun olduğu belirtilmiştir. Bleomisin ile oluşturulan hasar mekanizmaları arasında, oksidan-aracılı DNA hasarı ve fibrojenik sitokinlerin salınımı, apoptoz, matriks metalloproteinlerinde ve ekstraselüler çinko bağımlı enzim seviyelerinde azalma da rol oynamaktadır.¹²⁹

Doğum öncesi yangının BPD gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu bilindiğinden BPD ile ilgili bazı çalışmalarda amniyon sıvısına lipopolisakkarit (LPS) verilerek akciğer hasar modeli oluşturulmuştur. Bu yöntemde 20. gebelik haftasındaki anne sıçana karın kesisi yapıp amniyon sıvısına E. Coli O111:B4 suşunun lipopolisakkariti verilmekte, bir veya iki hafta sonra gerçekleşen normal doğumu takiben bir hafta hiperoksi uygulanmaktadır. LPS verilmeden sadece hiperoksi uygulanması ile ılımlı derecede akciğer hasarı olduğu, doğum öncesi LPS verilip doğum sonrası hiperoksi uygulanması ile BPD'ye benzer şekilde alveolarizasyonda duraklama (hava alanlarında genişleme ve alveolar yüzey alanında azalma) olduğu izlenmiştir. Amniyon sıvısına LPS verilmesinin yenidoğan sıçanın akciğerlerini hiperoksik hasar için hassas hale getirdiği ve alveolarizasyonu bozduğu belirtilmektedir. Alveol şeklinin oluşmasında ikincil septasyonun myofibroblastlarca başlatıldığı bilinmektedir. LPS aracılı akciğer hasar modeli oluşturulan sıçanlarda LPS'nin akciğerlerde myofibroblast yerleşimini bozduğu, myofibroblastların ikincil septasyon alanlarının etrafında azalmış olup daha çok birincil septasyon alanlarında yoğunlaştığı saptanmıştır. Bu yöntemle oluşturulan akciğer hasarının patogenezinde LPS'lerin endotelial büyüme faktörü reseptörlerini aktive etmesi, myofibroblastlardaki TGF- α 'nın aşırı yapımının uyarılması ile myofibroblast göçünün bozulması, böylece kritik ikincil septasyon için gereken myofibroblast yerleşiminin gerçekleşmemesi yer alır.^{130,131}

BPD çalışmalarında en sık hiperoksi aracılı akciğer hasar modeli kullanılmaktadır.

Hiperoksiye yanıt olarak hücre içi reaktif oksijen türevlerinin arttığı, proteinaz/antiproteinaz dengesinin bozulduğu, yangı ve stres cevabının ortaya çıktığı, hücre büyüme ve farklılaşma düzeninin bozulduğu görülmüştür.⁴⁷ Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile paralel olarak akciğer endotel ve epitelyal hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir.⁶² Hiperoksi distal hava yollarında dallanmayı baskılayarak, gelişimin duraklamasına neden olmaktadır.⁶³ Hiperoksi maruziyetinin yakın dönemde gösterilmiş hasar mekanizmaları arasında; özellikle nötrofil aktivasyonuna neden olması ve bu yolla endotel ve epitel hücre hasarı yapması,⁶⁴ TGF- α ⁶⁵ ve lökotrien düzeylerini arttırması,⁶⁶ hücre çekirdeğinde yangı, koagülasyon, fibrinoliz yapması, hücre döngüsü genleri üzerinde etkin olması⁶⁷ ve endotelin-1 düzeylerini arttırması⁶⁸ sayılabilir. Tüm bu mekanizmalar sonucu alveolar gelişimde geriye dönüşümsüz olarak gerçekleşen duraklama olması ve uygulamanın kolaylığı yöntemin tercih edilmesine neden olmuştur. Özellikle kök hücre tedavileri ile ilgili çalışmalarda bu modelin tercih edilme nedeni, hiperoksinin akciğerdeki kök hücre miktarını azaltarak alveolar gelişimi duraklattığının ve dışarıdan verilen kök hücrenin etkisi ile bu duraklamanın önlendiğinin düşünülmesinden dolayıdır.

Bu çalışmada, mezenkimal kök hücre tedavisinin etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmış olup yöntemin çalışma amacına uygun, kolay ve ucuz olması dikkate alınmış ve hiperoksik akciğer hasarı modeli seçilmiştir.

2.10. Güncel ve Gelecek Tedaviler

İlk tanımlanmasından beri yaklaşık 40 yıl geçmiş olmasına rağmen BPD erken doğumun istenmeyen sonuçlarından biri olmaya devam etmektedir. Günümüzde BPD'nin akciğer gelişiminde duraklama olduğu bilinmektedir. Gelecekteki çalışmalar uzun dönem düzelme sağlayan ve akciğer gelişimindeki duraklamayı ortadan kaldırma tabanına oturan çalışmalar olmalıdır.

Hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan hayvan modellerinde endotelial ve mezenkimal öncül hücrelerin hasar sonrası onarım yaptığı saptanmıştır.¹¹ Endotelial öncül hücreler (Endothelial Progenitor Cell, EPH) ve mezenkimal kök hücreler (MKH) kordon kanından kolayca ayrıştırılabilmektedir. Gebeliğin 24-28. haftalarında kordon kanında baskın olan MKH'ler iken 32-36. haftalarda EPH'lerdir.^{132,133} Yenidoğan fare yavrularında hiperoksiye maruziyet sonrası kemik iliği, dolaşım ve akciğerlerde

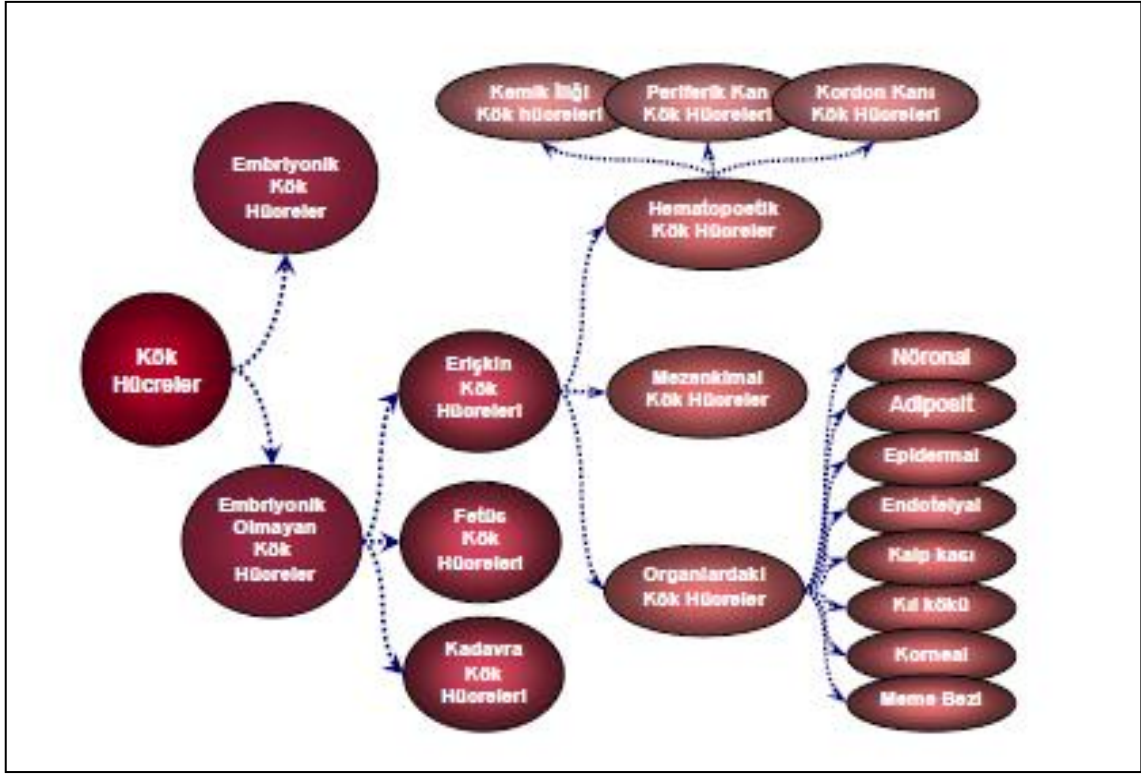
EPH'ler belirgin olarak azalmış bulunmuştur. ADDA'lı bebeklerde erken doğuma bağlı kordon kanında azalmış EPH'ler, yeni BPD patogenezindeki akciğerlerin damarsal olgunlaşmamışlığını açıklar. Bu durum kordon kanından türetilen hücreler ile tedaviyi gündeme getirmiştir. Hayvan çalışmaları kök hücre bazlı tedavilerin diğer tedavilere göre daha etkin olduğunu bildirmektedir.

Hiperoksi aracılı BPD modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında MKH'lerin ve anjiogenik öncül hücrelerin etkin tedavi edici etkisi gösterilmekle beraber bu hücrelerin henüz uzun dönemdeki etkileri bilinmemektedir.

2.10.1. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücre Tanımı

Kök hücre; kendisini yenileme ve farklılaşma yeteneğindeki hücre olarak tanımlanır.¹³⁴ Daha önceleri kök hücrelerle ilgili bilgiler tedavide kullanılmakta olan hematopoetik kök hücreler ile ilgiliydi. Son yıllarda kök hücre tipleri, bu hücrelerin temel biyolojik özellikleri, uygun ortam şartlarında ve uygun uyarılarla farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri (plastisite) ile ilgili bilgiler hızla artmıştır. Özellikleri sayesinde hasarlanmış doku tamiri ya da yenilenmesi olanağı sunan kök hücreler “rejeneratif tıp” kavramının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılabilirler. Vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahip kök hücreye “totipotent kök hücre” denir ve bunun tek örneği zigottur. Erken embriyonel dönemde dört hücreden sekiz hücreye kadarki tüm blastomerler totipotent kabul edilir.¹³⁵ Bu evreden sonra oluşan blastokist iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler ise endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli birçok hücre tipine dönüşme yeteneğinde olup bunlara “pluripotent kök hücre” denir. Pluripotent kök hücreler yaklaşık 200 hücre tipine dönüşebilecek kapasiteye sahiptir ancak işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar. Gelişimin ilerleyen döneminde, buldukları alan ile sınırlı, ancak özel bir uyarı ile farklılaşma yeteneğinde olan ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelere ise “multipotent kök hücre” denir ve bunun en iyi örneği hematopoetik kök hücrelerdir.^{136,137} Multipotent kök hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar. Kök hücre kaynakları Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Kök hücre kaynakları

İlk kez kemik iliği nakli şeklinde 1960'larda başlayan kök hücre tedavileri, günümüzde çoğu neoplastik hematolojik hastalıklar olan birçok hastalıkta uygulanmaya başlamıştır. Hastanın kendisinden (otolog) veya sağlıklı başka bir bireyden (allojeneik) elde edilen hematopoetik hücreler, uygulandıklarında kemik iliğine giderek yerleşebilmekte ve yeni kan seri hücrelerini oluşturabilmektedirler.

Kök hücre kaynağı “erişkin” (kemik iliği, periferik kan, kordon kanı, organa özgü erişkin kök hücre) ve “embriyonel” (blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonel kök hücre) olabilir.

Hematopoetik kök hücrelerden sadece kan seri elemanlarının değil birçok hücrelerin farklılaşmasının olduğunu gösterilmesi ile “kök hücre plastisitesi” kavramı ortaya çıkmıştır. Günümüzdeki çalışmalarda hematopoetik kök hücrelerden kemik, kıkırdak, nöral hücreler, pnömositler, deri, kas, epitel, endotel hücreleri, böbrek ve karaciğere ait hücrelerin geliştirilebildiği ve bunların sadece şekilsel değil işlevsel olabileceği *in vitro* çalışmalarda ve bazı hayvan deneylerinde ortaya konmuştur.¹³⁸

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler dışında tanımlanan kök hücreler de olup bunlardan en sık kullanılanı mezenkimal kök hücrelerdir. Bu, insandaki klinik

çalışmalarda, sıklıkla tercih edilen kök hücre grubudur. Çünkü MKH'ler kolay izole edilir, *in vitro* kültürlerde işleme sokulabilir ve yüksek plastisiteye sahiptir.

MKH, kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir. MKH'lerin kemik, kıkırdak, yağ hücresi ve sinir hücrelerini oluşturabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, fibroblast ve iskelet kası hücreleri gibi mezodermal hücrelere, mezodermal kökenli olmayan endotel ve nöroektoderm de dahil ektodermal hücrelere farklılaşabildikleri de gösterilmiştir. CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ -integrin) gibi belirteçleri eksprese ederler.

2.10.2. Tedavisinde Kök Hücre Kullanılan Hastalıklar

Nöron, kalp kası, kondrosit gibi farklılaşmış hücreler yaşlanma, travma ve dejeneratif hastalıklar sonucu ciddi hasara uğrar ve yenilenemezler. Plastisitesi olan kök hücrelerin, çoğalmalarının kontrol edilebilmesi halinde, *in vitro* olarak farklı hücre tiplerine dönüştürülmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla; yeni ilaçların geliştirilmesi, etkinlik ve sitotoksisitesinin değerlendirilmesinde, hasarlı hücre onarımı veya ölümü durumunda kullanılabilirler. Ancak *in vitro* farklılaştırılan hücrelerin *in vivo* tedavide kullanımları için hücrelerin çoğalma kontrol mekanizmasının ve genetik yapısının çok iyi biliniyor olması gereklidir. Tedavide kullanımları için üzerinde çalışılan hastalıklar şunlardır:

- Kalp kası yenilenmesi,
- Yangısal ve dejeneratif kıkırdak ve kemik hastalıkları,
- Diyabet,
- Ateroskleroz nedeniyle işlevini kaybeden kan damarlarının yenilenmesi,
- Alzheimer ve Parkinson gibi merkezi sinir sistemi hastalıkları,
- Omurilik yaralanmaları,
- Karaciğer hasarı,
- Çeşitli kanserler,
- Ortopedik kusurlar,
- İmpotans gibi ürolojik problemler,
- Bazı deri hastalıkları.

Hasarlı myokarda kardiyomyosit sağlayacak kök hücre aktarılması günümüzde kalp nakli dışında tedavi seçeneği olmayan hastalar için umut vericidir. Deneysel

çalışmalarla birlikte etik ve immünolojik sorunlar da devam etmektedir.

Kök hücrelerin zaman içinde mutasyonlardan etkilenip etkilenmeyeceği, gelişebilecek tümör oluşumları, nakledilen hücrelerin reddinin engellenmesine yönelik deneyimlerin geliştirilmesi kök hücre çalışmalarında devam eden sorunlardır.

2.10.3. Bronkopulmoner Displazide Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Gelecekteki Yeri

Uzun dönemde solunumsal ve nörogelişimsel sonuçları ile BPD çocukluk çağına da uzanan ve sağlık maliyetini arttıran bir durumdur. Erkendoğan bebeklerde gelişen BPD'de akciğerlerin ve damarsal büyümenin duraklamasını önleyen etkin bir tedavi yoktur. Sakatlık olmaksızın yaşam sağlayan ilerlemelere ihtiyaç vardır. Uyarıcı yayınlarda BPD'nin erken başlangıçlı amfizemle sonlandığı bildirilmektedir.^{139,140} Amfizem, distal bronşiolardan terminal bronşiolere kadar hava alanlarının genişlemesi olup bu kronik obstrüktif akciğer hastalığının da esas bileşenidir. BPD ve amfizem, alveolar yapının bozulması ve gelişimin duraklaması ile karakterize olup sadece destek tedaviler yapılabilir. ^{139,140}

Artan dikkatler erişkinlerden elde edilen kök hücrelerin organ hasarlarını onarmasına odaklanmıştır. Enjekte edilen fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, akciğer de dahil, çeşitli hematopoetik olmayan dokularda o dokunun parankimal hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir.⁶ Bu durum yenidoğanın doğumsal metabolik, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde kullanılmak istenmektedir.^{7,8} Ancak alveolar hasarla giden akciğer hastalıklarında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisiyle ilgili çalışmalar çok azdır. Erişkin akciğer hasar modellerinde, kemik iliğinden türetilen hücrelerin akciğere yerleşebildiği ve çeşitli akciğer hücre fenotiplerine dönüşebildiği izlenmiştir.^{9,10} Yapılan bir çalışmada, hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda geriye dönüşümsüz alveolar ve kapiller azalma olduğu, bunun BPD'deki patolojik bulgulara oldukça benzediği ve kemik iliğinden elde edilen kök hücre verilmesi ile alveolar büyümede duraklamanın ve sayıca azalmanın önlendiği, egzersiz kapasitesi ve yaşayabilirliğin arttığı ile ilgili kanıtlar sağlanmıştır.¹¹

2.10.4. Bronkopulmoner Displazi Tedavisinde Kök Hücrelerin Olası Etki Mekanizmaları

Kök hücre tabanına oturan onarıcı tedaviler daha çok onkoloji hastalarında ve immün yetmezliklerde standart tedavi yöntemi haline gelmiştir. Hipoksik iskemik ensefalopati ve BPD gibi ağır yenidoğan hastalıklarında kök hücre tedavisinin kullanımı henüz klinik öncesi hayvan çalışmaları halindedir.

Sıklıkla hiperoksi aracılı akciğer hasar modellerinde, kemik iliği türevi MKH'lerin *in vitro* olarak göç potansiyeli ve tip II alveolar epitelyal hücre için özel belirleyici olan sürfaktan proteini-C (SP-C) ekspresyonu incelenmiştir. Sonuçlarda MKH'lerin hasarlı dokuya yerleştiği, SP-C eksprese ettiği, akciğer fibrozisini hafiflettiği ve sağkalımı arttırdığı saptanmıştır. Bu olumlu etkinin, MKH'lerin akciğerlerin kendi epitelyal hücrelerini aktifleştirmesine bağlı olduğu öne sürülmüştür. Bronkoalveolar kök hücreler kültür ortamında kendini yenileyen ve farklılaşabilen hücreler olup bronşioler ve alveolar hasarda çoğalarak onarım yapmaktadırlar.¹⁴¹

MKH'lerin verildiği dokuya düşük oranda yerleşmesine rağmen tedavi edici etki oluşturmaları bu hücrelerin başka bölgesel etkilerinin de olduğunu düşündürmüştür. MKH'lerin parakrin etkilerine dair kanıtlar artmaktadır. Spinal kordon hasarından sonra onarımı başlatmada kök hücrelerden salınan nörotrofik maddelerin kök hücrelerden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır.¹⁴² MKH'lerin üretildiği kültür ortamının hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan sıçanlara verildiği bir çalışmada hasara bağlı gelişen tip II alveolar epitelyal hücrelerin apoptozunda azalma olduğu bulunmuştur.¹¹ MKH'lerin ürettiği kültür ortamının verilmesi ile IL-1 α bağımlı T hücre serisinin ve makrofajlar tarafından uyarılan Tümör Nekroz Faktörü- α 'nın baskılandığı gösterilmiştir.¹⁴³ Bu etkiler verilen MKH'ler ile akciğer hücreleri arasındaki olumlu etkileşimlere, MKH'lerin sadece kendisinin değil salgıladığı maddelerin de apoptozu önlemesine bağlanmıştır.

Çalışmalar kök hücrelerin akciğer hasarında tedavi edici etkisini göstermekle birlikte yeni alveol oluşumu ve destek doku kaybının yerine konmasını sağlayan kanıtlar henüz yoktur. Bu çalışmada; hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda trakeal yolla verilen mezenkimal kök hücrelerin akciğer dokusunda oluşturduğu histopatolojik değişimlerin ve akciğer dokusuna yerleşiminin gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Ekibi

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Histoloji-Embriyoloji, Patoloji, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalları işbirliğiyle yürütülmüştür.

3.2. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

3.3. Gereçler

Deneyde; hiperoksik akciğer hasarı oluşturma sürecinde hiperoksi odacığı, oksijen ölçer, hava iletimi için ara bağlantı hortumları ve % 100 solunabilir oksijen; ortam ısı ve nemini ölçmek için elektronik aygıt; deri ve deri altı dokuların açılması ve trakeotomi için pens ve bistüri; deri kapatmada 3-0 ipek ve portegü; mezenkimal kök hücre, besiyerleri ve plasebonun trakeal yolla verilebilmesi için Hamilton enjektörü; akciğerlerin çıkarılması sürecinde ketamin ve ksilazin; patolojik örneklerin hazırlanmasında formaldehit ve paraformaldehit kullanıldı.

3.4. Deney Hayvanları

Çalışmaya yeni doğmuş Wistar Albino cinsi sıçan yavruları alındı. Hayvanlar deneyin tüm aşamalarında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda tutuldu.

3.5. Çalışma Grupları

Wistar Albino cinsi sıçanlar doğumlarından itibaren altı gruba ayrıldı. Kök hücre verilecek grupta 20, Normoksi, Sham, Plasebo, Medyum ve Vasat gruplarında ise 11 sıçanla çalışma planlandı. Deney sırasında kaybedilen sıçanlar nedeniyle bazı gruplar

planlanan sayıdan daha az sıçan içerdi.

- **Normoksi grubu (Grup N) (n=11):** Doğumdan itibaren oda havası soluyan sıçan yavruları bu grupta olup anne sıçan da oda havası soludu. Bu grubu besleyen anne sıçan, hiperoksik grubun yedeği olan anne sıçan olarak kullanılmadı, böylece kontrol grubundaki yavru sıçanlar hiperoksiye maruz kalan anne sıçanların sütünden korunmuş oldu.

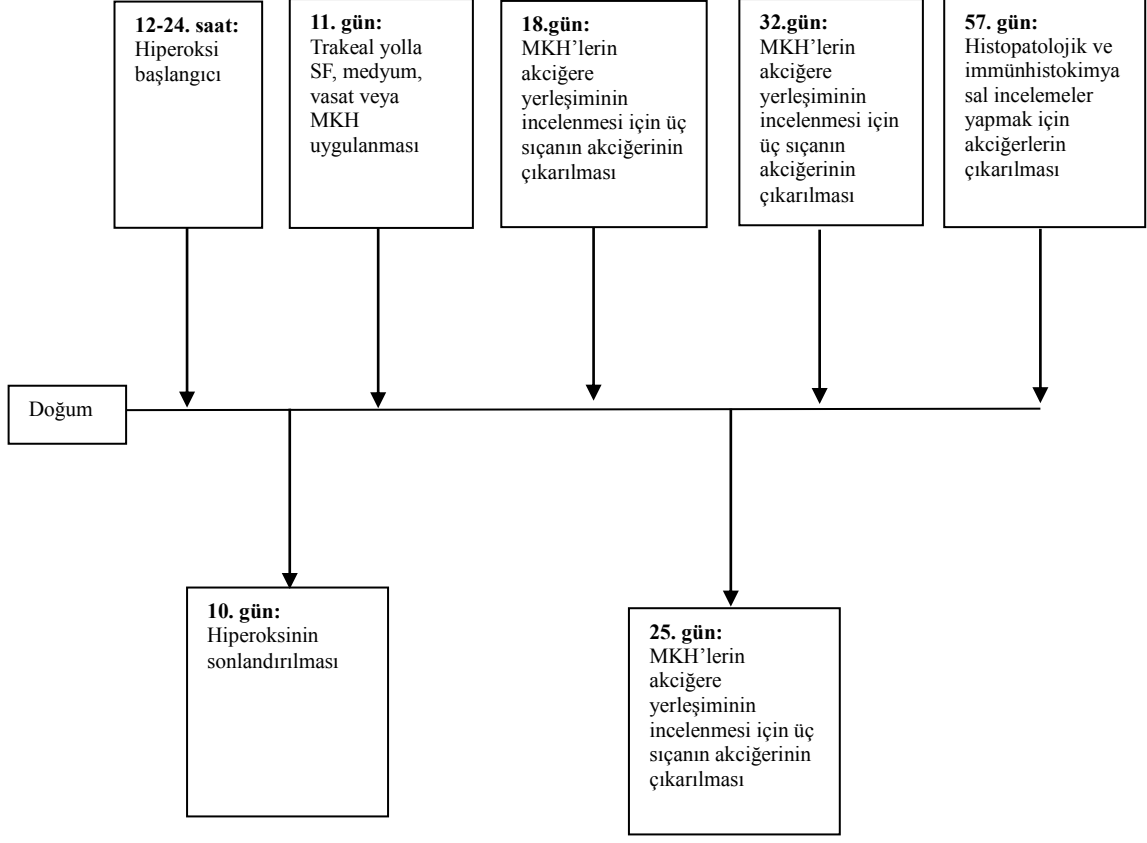
- **Sham grubu (Grup S) (n=11):** Doğumdan itibaren oda havası soluyan ve 11. günde orta hat boyun kesisi ile deri-deri altı açılan, trakea bulunup iğne batırılan ve deri-deri altı dokuları 3-0 ipek ile kapatılan bu grup deneyde cerrahi ve anestezinin olası etkilerinin dışlanabilmesi için oluşturuldu.

- **Hiperoksi + plasebo grubu (Grup P) (n=9):** Doğumdan sonraki 12-24. saatler arasında, oksijen yoğunluğu % 85-95 olan hiperoksi odacığına konan, uygulama başlangıcından itibaren 10 gün hiperoksiye maruz bırakılan sıçan yavrularına 11. gün, trakeadan 25 µl serum fizyolojik (SF) verildi.

- **Hiperoksi + medyum grubu (Grup M) (n=10):** Hiperoksi uygulamasından sonra 11. günde bu gruptaki yavru sıçanlara, içinde kök hücre bulunmayan 25 µl taze hücre kültürü sıvısı (Mesencult[®] MSC Basal Medium, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) trakeadan verildi.

- **Hiperoksi + vasat grubu (Grup V) (n=8):** Hiperoksi uygulamasından sonra 11. günde bu gruptaki yavru sıçanlara, kök hücrelerin ürettiği ve kök hücreler ortamdan kaldırıldıktan sonra kalan hücre kültürü sıvısı (vasat) 25 µl olarak trakeadan verildi. Böylece kök hücrelerin çoğalması sırasında ortama bıraktığı endojen maddelerin olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

- **Hiperoksi + MKH grubu (Grup MKH) (n=17):** Hiperoksi uygulamasından sonra 11. günde bu gruptaki yavru sıçanlara, 25 µl medyum içinde 10^5 MKH trakeadan verildi. Verilen MKH'lerin akciğerlere yerleşip yerleşmediğini incelemek amacıyla, MKH verildikten 1, 2 ve 3 hafta sonra üçer sıçanın akciğerleri çıkarıldı. Kalan sekiz sıçanın akciğerleri ise hem histopatolojik hem de immünohistokimyasal inceleme yapmak amacıyla 57. gün çıkarıldı. Şekil 6'da deney uygulama takvimi görülmektedir.



Şekil 6. Deney uygulama takvimi

3.6. Hiperoksik Akciğer Hasarının Oluşturulması

Hiperoksik akciğer hasarı oluşturmada, önceden tanımlanmış olan hiperoksi aracılı BPD modelinden yararlanıldı.²⁷ Yavru sıçanlara doğumu takiben 12-24. saatler arasında hiperoksi uygulanmaya başlandı ve 10 gün süreyle hiperoksi uygulamasına devam edildi.^{34,144} Bu amaçla pleksiglastan imal edilen kapalı bir odacık oluşturuldu, ara bağlantı hortumları ile 10 gün boyunca odacık içine devamlı % 100 oksijen verildi. Odacık içindeki oksijen yoğunluğu oksijen ölçer ile (Hudson RCI® Oxygen Analyzer, USA) sık sık ölçülerek yoğunluğunun % 85-95 arasında kalması sağlandı. Anne sıçanların hiperoksiye bağlı ölümlerinin önlenmesi amacıyla 24 saatte bir yapılan besin-su ikmali ve kafes bakımı sırasında hiperoksi odacığındaki anne sıçan, oda havası soluyan ve aynı günlerde doğum yapmış olan diğer bir anne sıçan ile değiştirildi.¹⁴⁵ Sıçan yavruları doğumdan itibaren anne sütü ile beslendi. Her kafeste en fazla 12 sıçan bulunmasına izin verildi. Sıçanların bulunduğu ortamda 12 saat gündüz, 12 saat gece

ortamı sağlandı. Oda sıcaklığı 22-24°C, nem % 60-80 arasında tutuldu. Oda havasında tutulan anne sıçan ve yavruları ile hiperoksi uygulanan sıçanlar deney süresince aynı odada bulunduruldu. Hiperoksi uygulanmasının 10. günü tamamlandığında işlem sonlandırıldı ve sıçanlar oda havası solumaya başladı (Şekil 7 ve 8).



Şekil 7. Deney düzeneği. Alt rafta pleksiglastan yapılan hiperoksi odacığı içinde çalışma grubundaki yavru sıçanlar ve anne sıçan, üst rafta oda havası soluyan yavru sıçanlar ve anne sıçan ile birlikte sağda hiperoksi düzeneği görülmektedir.



Şekil 8. Hiperoksi odacığının yakından görünümü

3.7. Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Mezenkimal Kök Hücre Üretimi

Kök hücreler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embiryoloji Anabilim Dalı'nda üretilerek kullanılmıştır.

Ketamin ve ksilazin anestezisi ile uyutulan sağlıklı erişkin sıçanların, aseptik koşullarda derisi ve kemikler etrafındaki kas ve yumuşak dokuları sıyrılıp tibia ve femurların alt ve üst uçları kesildi. Bacaklar, % 70'lik alkole batırılıp çıkarıldıktan sonra steril izotonik çözeltisi içinde laboratuvara getirildi. Steril kabin içinde her bir kemiğin içinden enjektörle 2 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) geçirildi ve steril bir tüpe kemik iliği toplandı. Tüpteki hücreler yeniden süspansiyon haline getirilip başka bir tüpe 2,5 ml ficoll kondu, üzerine hücre süspansiyonu çok yavaş bir şekilde eklendi ve bu tüp 30 dakika, dakikada 1800 devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre süspansiyonu ve ficoll arasındaki bölgede toplanan hücreler bir pipetle dikkatlice alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı. Toplanan bu hücreleri ficollden arındırmak için hücre süspansiyonunun beş katı kadar steril fosfat tampon tuzu (Phosphate Buffer Saline, PBS) eklenerek pipetaj yapıldı ve dakikada 1800 devirde beş dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atılarak dipte kalan kısma tekrar 3 ml steril PBS eklenerek yeniden süspansiyon haline getirildi ve dakikada 1800 devirde beş dakika santrifüj edildi. Yine üst kısım atılarak dipteki kısım üzerine 2 ml kadar katkılı % 10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), % 1 Pensilin-Streptomisin ve % 2,5 L-Glutamin düşük glikozlu DMEM eklendi. Pipetaj yapılarak hücreler süspansiyon edildikten sonra bu karışım 25 cm²'lik bir flaska konuldu ve üzerine 3 ml daha katkılı DMEM'den eklenerek, toplam 5 ml'ye tamamlandı. Hücreler % 5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kondu ve üç günde bir medyumları değiştirildi. Bu işlem, hücreler çoğalarak flaskın tabanını kaplayana kadar sürdürüldü.

3.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücre Kültürü Ortamından Kaldırılması

Yayılan hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı, yıkandı ve trypan mavisi atılım testi uygulandıktan sonra, bir Thoma lamı ile sayıldı. Yayılan hücrelerden bir kısmı altı kuyulu petri kaplarına pasajlandı. Burada tutunan ve çoğalan hücreler % 4 paraformaldehit ile tespit edildikten sonra CD34 ve STRO-1 antikorları ile immünfloresan yöntemle işaretlendi. CD34 negatif STRO-1 pozitif olan hücreler kemik iliği mezenkimal kök hücreler olarak kabul edildi. Bu doğrulandıktan ve transfeksiyon yöntemiyle işaretleme yapıldıktan sonra pasajlanan hücreler toplanıp, sayım sonrası 25 µl'de 10⁵ adet hücre olacak biçimde süspansiyon kültür medyumunu ile sulandırıldı.

3.9. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transfeksiyon Yöntemiyle İşaretlenmesi

MKH'ler trakeal yolla verilmeden önce dokuda gösterilebilmesi amacıyla transfeksiyon işlemi ile işaretlendi. Kök hücrelerin işaretlenmesinde kullanılacak, yeşil floresan proteinini (Green Fluorescent Protein, GFP) kodlayan plazmid öncelikle E.coli DH5 α suşuna transforme edilerek çoğaltıldı. Çoğaltma işleminden sonra elde edilen plazmid saflaştırılarak, agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Ultraviyole spektrofotometresinde elde edilen genetik materyalin protein saflığı belirlendikten sonra kök hücre transfeksiyon çalışmasında kullanıldı. İzole edilen kök hücrelere plazmid aktarılması için ticari katyonik lipid molekülleri kullanıldı.

Mezenkimal kök hücrelerin Monster Green Fluorescent Protein (pMGFP) Vector sistemi ile transfeksiyonu, Metafectene Pro Transfection Reagent kullanılarak gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminde üretici firmanın belirttiği basamaklar uygulandı. Transfeksiyondan bir gün önce 10^5 hücre, serum ve antibiyotik içeren 2 ml DMEM besiyerinin bulunduğu altı kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğuna ekildi. Hücreler normal büyüme koşulları altında (37°C ve % 5 CO_2) inkübe edildi.

Transfeksiyon yapılacağı zaman 14 μl Metafectene pro reagent 100 μl tampon çözeltisi (PBS) ile karıştırıldı. Diğer bir tüpte ise 4,5 μg plazmid DNA ile 100 μl PBS karıştırıldı. Plazmid DNA'yı içeren karışım yavaş bir şekilde Metafectene pro reagenti içeren karışım üzerine eklendi. Bu karışım, oda sıcaklığında (25°C) 20 dakika boyunca kompleksin oluşumu için inkübe edildi. Kompleks oluşumunun gerçekleştiği sırada altı kuyucuklu tabakta bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve daha sonra hücreler 4 ml PBS ile yıkandı. Mezenkimal kök hücreler yüzeye yapışan hücreler olduklarından bu işlem esnasında ortamda kalmaları beklenmektedir. Yüzeye yapışık mezenkimal kök hücrelerin üzerine serum ve antibiyotik içeren 2 ml taze besiyeri eklendi. 20 dakika inkübe edilen transfeksiyon kompleksi, bekletilmeden altı kuyucuklu tabaklarda bulunan hücrelerin üzerine damlatılarak eklendi. Hazırlanan transfeksiyon kompleksi tek bir kuyucuk için olup birden fazla kuyucuk hazırlanmışsa, ona göre transfeksiyon kompleksi hazırlandı. Hücreler 72 saat bekletildikten sonra floresan mikroskop ile işaretli hücre oranı belirlendi ve sıçanlarda kullanılmak üzere hazırlandı.

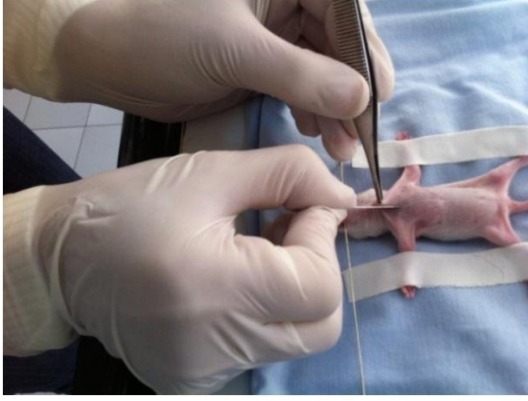
3.10. Floresan İşaretli Hücrelerin Sıçanlara Verilecek Duruma Getirilmesi

Sıçanlara verileceği gün hücreler, flask tabanından tripsin-EDTA solüsyonu ile beş dakika bekletilerek kaldırıldı. Kültür için kullanılan medyum ile hücreler bir kez yıkandı ve sayıldı. Santrifüj edildikten sonra hücre pelletinin üzerine 25 µl'de 100.000 hücre olacak şekilde katkılı kültür medyumunu eklendi. Bu hücre süspansiyonundan sıçanlara 25'er µl verilerek sıçan başına 100.000 GFP (+) hücre transferi sağlandı.

3.11. Trakeal Yolla Serum Fizyolojik, Medyum, Vasat ve Mezenkimal Kök Hücre Verilmesi ve Akciğerlerin Çıkarılması

Sıçan yavrularına plasebo, medyum, vasat ve MKH trakeal yolla verildi. Bu amaçla; 10 gün hiperoksi uygulanan gruplardaki sıçan yavruları izofluran anestezisi ile uyutuldu, deney masasına sabitlendi. Orta hat boyun kesisi ile deri-deri altı dokular açıldı, trakea bulundu ve çevre dokulardan ayrıştırıldı. Trakeal kıkırdaklar arasındaki yumuşak dokudan Hamilton enjektörü ile girilerek 25 µl hacmindeki plasebo (SF), medyum, vasat ve MKH yavru sıçan her soluk aldığı anda yavaşça verildi. Trakeal yolla verilecek mezenkimal kök hücre (MKH) miktarı, önceki çalışmalar esas alınarak, her sıçana 25 µl hücre kültür sıvısı içinde 10^5 hücre olacak şekilde belirlendi.¹¹ Trakeadan çıkılınca deri-deri altı dokular 3-0 ipek ile kapatıldı. Cerrahi uygulanan bölge povidon iyodin ile temizlendi (Şekil 9-12).

Yaşamın 57. gününde sıçanlar önce tartıldı, daha sonra ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi uygulanarak sternum açıldı, akciğerler çıkarıldı ve makroskopik değişiklikler kaydedilerek tartıldı. Akciğerler çıkartıldıktan sonra trakea yoluyla, 20 cmH₂O basıncıyla % 4 paraformaldehit solüsyonu verilerek akciğerler şişirildi. Daha sonra sağ akciğerin orta lobu çıkarıldı. Çıkarılan doku immünohistokimyasal inceleme ve patolojik skorlama yapmak için iki parçaya ayrıldı. İmmünohistokimyasal inceleme yapılacak olan doku % 4 paraformaldehit solüsyonunda +4°C'de bir gece bekletildi. Patolojik inceleme yapılacak olan akciğer dokusu ise % 10 nötral formol solüsyonu içeren kaplar içine kondu.



Şekil 9. Orta hat boyun kesisi



Şekil 10. Trakeanın bulunması



Şekil 11. Trakeal yolla serum fizyolojik, medyum vasat ve mezenkimal kök hücre verilmesi



Şekil 12. Cilt-cilt altı dokuların kapatılması

3.12. Trakeal Yoldan Verilen Kök Hücrelerin Akciğer Dokusuna Yerleşiminin Gösterilmesi

+4°C'de paraformaldehit içinde bir gece bekletilen doku önce 12 saat boyunca % 20 sükröz solüsyonuna, daha sonra da % 30 sükröz + % 0.1 sodyum azid (NaN_3) solüsyonuna alınarak en az bir gece bekletildi ve böylece dondurmanın zararlı etkilerinden korunması sağlandı (kriyoproteksiyon).

Dokulardan kriyostat (Leica CM1900, Leica Microsystems GmbH, Viyana-AVUSTURYA) ile 7 μm kalınlığında kesitler adheziv kaplı lamalar üzerine alındı. Daha sonra kesitlere aşağıda yazılı yöntemle immün işaretleme yapıldı:

- Kesitler pH değeri 7,4 olan fosfat tamponlu tuz solüsyonunda (PBS) yıkandı.
- % 0,1 Tween-20 ve % 0,5 sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA) içeren PBS'de 1:25 oranında dilüe edilmiş tavşan poliklonal anti-Sürfaktan Protein C (SP-C) primer antikoru (Kat. No: sc-13979, Santa Cruz Biotechnology Inc. California

ABD) damlatılarak +4°C’de bir gece inkübe edildi.

- PBS ile üç kez ikişer dakika yıkandı.

- Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC) konjuge goat anti rabbit IgG-R sekonder antikoru (Kat. No: sc-2091, Santa Cruz Biotechnology Inc., California ABD) % 0,1 Tween 20 ve % 0,5 BSA içeren PBS’de 1:50 oranında sulandırıldıktan sonra kesitlere damlatıldı ve 90 dakika +37°C’de bekletildi.

- PBS ile üç kez ikişer dakika yıkandı.

- Hücre çekirdeğini göstermek için kromatini spesifik olarak boyayan 4’6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) maddesini içeren gliserin jel kapatma ortamıyla (Kat. No: sc-24941, Santa Cruz Biotechnology Inc. California ABD) kesitler kapatıldı.

İşaretlenmiş kesitler, Nikon Eclipse Ti inverted floresan fotomikroskopla (Nikon Corp., Tokyo, Japonya) incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.13. Akciğer Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi

Bir gecelik formaldehit tespit işlemi ardından dokular rutin takip işleminde alkol, ksilol ve parafin solusyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilin eozin histokimyasal boyası ile boyandı ve kapama maddesi ile kapandı.

Preparatlar çalışmanın diğer evrelerinden habersiz olan tek patolog tarafından ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i, USA) incelendi. Fotoğraflama işlemi Nikon dijital kamera DS-L1 ile yapıldı.

3.13.1. Morfolojik Analiz ve Akciğer Hasarının Skorlanması

Hematoksilin eozin ile boyanmış kesitler ışık mikroskopik düzeyde akciğer parankim çatısı ve amfizem oluşumu, ödem gelişmesi, nötrofil lökosit infiltrasyonu,^{146,147} fibrozis,¹⁴⁸ konjesyon ve kanama varlığı^{149,150} açısından ayrı ayrı değerlendirildi (Tablo 5).

Tablo 5. Hiperoksi aracılı akciğer hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan skorum sistemi

Fibrozis için evreleme sistemi	
Derece	Histolojik bulgular
0	Normal histolojik bulgular
1	İnteralveolar septada ve tüm parankimde olan, parankimin % 50'sinden azını tutan belli belirsiz bağ dokusu artımı. Akciğer parankim hasarı yok.
2	İnteralveolar septada ve tüm parankimde olan, parankimin % 50'sinden fazlasını tutan belli belirsiz bağ dokusu artımı. Akciğer parankim hasarı yok.
3	İnteralveolar septada ve tüm parankimde olan, parankimin % 50'sinden azını tutan belirgin bağ dokusu artımı yanı sıra parankim içerisinde fibröz bantların veya izole fibröz nodüllerin eşlik etmesi.
4	İnteralveolar septada ve tüm parankimde olan, parankimin % 50'sinden fazlasını tutan, daha belirgin bağ dokusu artımı yanı sıra parankim içerisinde fibröz bantların veya yaygın fibröz nodüllerin eşlik etmesi.
Nötrofil infiltrasyonu evreleme sistemi	
Derece	Histolojik bulgular
0	Normal histolojik bulgular
1	Alveolar septada ve alveol lümenlerinde serpintiler halinde ve akciğer parankiminin % 25'inden azını tutan nötrofil infiltrasyonu
2	Alveolar septada ve alveol lümenlerinde serpintiler halinde ve akciğer parankiminin % 25 ile % 50'sini tutan nötrofil infiltrasyonu
3	Alveolar septada ve alveol lümenlerinde serpintiler yanı sıra yer yer agregatlar oluşturan ve akciğer parankiminin % 50 ile % 75'ini tutan nötrofil infiltrasyonu
4	Alveolar septada ve alveol lümenlerinde yaygın infiltrasyon oluşturan ve akciğer parankiminin % 75'inden fazlasını tutan nötrofil infiltrasyonu
İnterstisyel ve alveolar ödem evreleme sistemi	
Derece	Histolojik bulgular
0	Normal histolojik bulgular
1	Alveolar septada perivasküler genişleme
2	Alveolar septada perivasküler genişleme yanı sıra alveol lümenlerinde yama tarzında ödem formasyonu
3	Alveolar septada perivasküler genişleme yanı sıra alveol lümenlerinde daha yaygın ancak parankimin % 50'sinden azını tutan ödem formasyonu
4	Alveolar septada perivasküler genişleme yanı sıra parankimin % 50'sinden fazlasının tutan ödem formasyonu
Konjesyon ve alveoler kanama için evreleme sistemi	
Derece	Histolojik bulgular
0	Normal histolojik bulgular
1	Alveolar septada damarlar çevresinde genişleme ve alveol lümenlerinde birkaç eritrosit grubu
2	Alveolar septada damar lümenlerinde belirgin genişleme, alveol lümenlerinde alveolü tam doldurmayan eritrosit kümeleri
3	Alveolar septada damar dışında eritrosit sızması, alveol lümenlerinde alveolü kısmen dolduran eritrosit kümeleri
4	Alveolar septada kanama odakları, alveol lümenlerini tamamen dolduran eritrosit kümeleri

Alveolar çatı ve amfizem oluşumunu değerlendirmek için, her örnekte rastgele olarak seçilen beş alanda x200 büyütme ile ortadaki çizgisel hat boyunca (çizgisel uzunluk 1006 μ) alana düşen alveol sayısı hesaplandı. Toplam uzunluk alveol sayısına bölünerek ortalama alveol yoğunluğunu gösteren alveol sayısı ve ortalama alveol çapı

hesaplandı.^{144,151,152}

3.13.2. Myofibroblastların α -SMA Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Yöntemle Tespiti

Parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon ve alkol takip işlemleri ardından, avidin-biyotin kompleks immün peroksidaz yöntemi ile monoklonal mouse anti- α -SMA antikoru (Neomarkers, 1:100 dilution, MS-113P) uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde Lab-Vision, Ultravision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready to Use) biyokimyasal kit, zemin boyaması için Mayer hematoksilen kullanıldı. Dokular üzerinde normalde damar ve kas dokuları bulunduğundan eksternal kontrol çalışılmadı, internal kontrol olarak bu alanların pozitifliği değerlendirildi.

α -SMA (Smooth Muscle Actin) ekspresyonuna göre fibrozisi değerlendirmek için; x40 büyütmede tüm akciğer alanları tarandıktan sonra üst üste gelmeyen x200 büyütme için skorlama için kullanıldı. α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığı (A) ve bu hücrelerdeki boyanma yoğunluğu (B) için 1-4 arası semikantitatif skorlama skalası kullanıldı. Yaygınlık (A) için aşağıdaki skorlama kriterleri oluşturuldu.¹⁵³

- Alveolar septada belli belirsiz α -SMA pozitif hücreler,
- Alveolar septada tek tek ve/veya küçük gruplar oluşturan α -SMA pozitif hücreler,
- Alveolar septada daha çok birkaç hücrelik gruplar oluşturan α -SMA pozitif hücreler,
- Alveolar septada yaygın α -SMA pozitif hücreler.

Yoğunluk (B) için ayrı skorlama aşağıdaki şekilde yapıldı.

- Tüm alanlarda yaygın soluk boyanma,
- Soluk boyanma yanı sıra bölgesel orta derecede boyanma alanları,
- Tüm alanlarda orta derece boyanma alanları,
- Orta derece boyanma alanları yanı sıra alanların yarısından çoğunda yoğun boyanan odakların varlığı.

Toplam boyanma skorunu elde etmek için her olguda AxB hesaplandı. Elde edilen sonuçlar 4 ve altında ise düşük boyanma skoru, 4'ün üzerinde ise yüksek boyanma skoru olarak değerlendirildi.

3.14. İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen sürekli yapıdaki verilerin normal dağılıma uygunluk kontrolleri Shapiro Wilk testi ile çalışılmıştır. Veriler normal dağılıma sahip bulunduğundan tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Ayrıca kategorik yapıdaki veriler için tanımlayıcı istatistik olarak sayı ve yüzdeler hesaplanmıştır. Parametrelerin ortalama değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğinin kontrolüne varyans ve kovaryans analizi ile bakılmıştır. Grupların ikişerli karşılaştırmasında Tukey testi ve grupların kontrol grubuna göre karşılaştırılmasında Dunnett-t testi tercih edilmiştir. Kategorik yapıdaki değişken ile grupların karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. İki oran arasında fark olup olmadığının kontrolüne z testi ile bakılmıştır. İstatistik anlamlılıkta $p < 0.05$ alınmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Tüm gruptaki sıçanların ağırlıkları normoksik gruptaki sıçanlarla, sonra da birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 6).

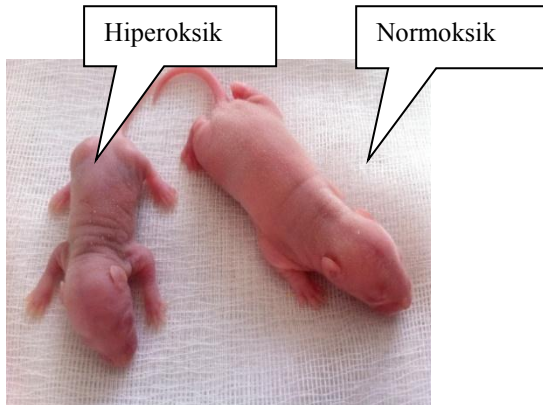
Grup N ile Grup S'deki sıçanların 10. gündeki ağırlıklarının ortalaması arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0,619$). Grup P, M, V ve MKH'deki sıçanların 10. gündeki ağırlıklarının ortalamaları Grup N'deki sıçanlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (tüm gruplar için $p<0,001$). Grup P'nin 10. gündeki ağırlık ortalaması ile Grup M, V ve MKH'nin 10. gündeki ağırlık ortalaması arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Hiperoksik gruptaki sıçanların erken dönemdeki ağırlık kaybı belirgin olup Şekil 13 ve 14'te gösterilen fotoğraflarda fark açıkça izlenmektedir.

Grupların 57. gündeki ağırlıklarının ortalamaları arasında normoksi grubuyla ve birbirleriyle karşılaştırmada anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,086$). Ancak hiperoksik gruplarda ağırlık az da olsa daha düşüktü.

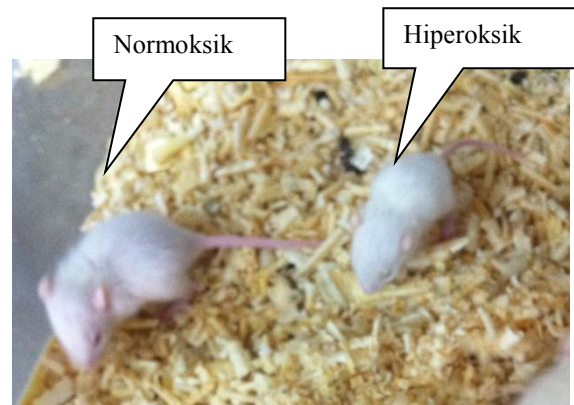
Tablo 6. Grupların 10. ve 57. gündeki ağırlık ortalamaları

	GRUP N (n: 11)	GRUP S (n: 11)	GRUP P (n: 9)	GRUP M (n: 10)	GRUP V (n: 8)	GRUP MKH (n: 8)	P
	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	
10. gün ağırlık (g)	17,0 \pm 0,9	17,6 \pm 1,2	12,5 \pm 0,7*	13 \pm 1,3*	13,1 \pm 0,5*	13,4 \pm 1,0*	<0,001
57. gün ağırlık (g)	124,6 \pm 10,8	123,4 \pm 14,4	116,7 \pm 10,1	121,1 \pm 13,9	119,8 \pm 12,9	107,2 \pm 15,5	0,086

*:Grupların normoksi grubu (Grup N) ile karşılaştırılmasında farklılıklar



Şekil 13. Normoksik ve hiperoksik sıçanların yedinci gündeki büyüklük farkı



Şekil 14. Normoksik ve hiperoksik sıçanların yirminci gündeki büyüklük farkı

4.2. Akciğer Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Grupların akciğer ağırlıkları normoksi grubuyla ve birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 7).

Grup N'nin akciğer ağırlıklarının ortalamasına göre, Grup P ($p=0,006$) ve Grup M'nin ($p=0,037$) akciğer ağırlıklarının ortalaması istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı. Bu farklılık Grup S, V ve MKH'de izlenmedi.

Tablo 7. Akciğer ağırlıklarının ortalamaları

	GRUP N (n: 11)	GRUP S (n: 11)	GRUP P (n: 9)	GRUP M (n: 10)	GRUP V (n: 8)	GRUP MKH (n: 8)	P
	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	
Akciğer ağırlığı (mg)	1216,3 \pm 420,4	1406,3 \pm 330,1	1700 \pm 439,8*	1591,2 \pm 224,8*	1226,2 \pm 127,9	1265 \pm 101,5	0,004

*: Grupların normoksi grubu (Grup N) ile karşılaştırılmasında farklılıklar

4.3. Alveol Sayısı ve Alveol Çapı Değişikliklerinin Karşılaştırılması

Grupların alveol sayıları ve çaplarının ortalamaları normoksi grubuyla ve birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 8).

Grup N'in alveol sayılarının ortalaması ile Grup S ($p=0,054$) ve Grup MKH'nin ($p=0,126$) alveol sayılarının ortalamaları arasında fark yoktu. Grup P ($p=0,003$), Grup M ($p<0,001$) ve Grup V'de ($p=0,015$) alveol sayıları Grup N'ye göre azalmıştı ve alveol sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Grup N'nin alveol çaplarının ortalaması ile Grup S ($p=0,26$), Grup V ($p=0,079$) ve Grup MKH'nin ($p=0,715$) alveol çaplarının ortalamaları arasında fark yoktu. Grup P ($p=0,012$) ve Grup M'nin ($p<0,001$) alveol çaplarının ortalamalarındaki artma Grup N'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Tablo 8. Alveol sayıları ve alveol çaplarının ortalamaları

	GRUP N (n: 11)	GRUP S (n: 11)	GRUP P (n: 9)	GRUP M (n: 10)	GRUP V (n: 8)	GRUP MKH (n: 8)	P
	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	Ortalama \pm SS	
Alveol sayısı	9,4 \pm 2,8	7,6 \pm 1,3	6,8 \pm 0,9*	6,2 \pm 1,1*	7,1 \pm 1,2*	7,7 \pm 0,4	0,001
Alveol çapı	123,2 \pm 41,0	144,6 \pm 23,6	162,5 \pm 22,2*	175,7 \pm 29,2*	154,2 \pm 24,6	137,5 \pm 8,4	0,002

*: Grupların normoksi grubu (Grup N) ile karşılaştırılmasında farklılıklar

4.4. Ödem, Fibrozis, Konjesyon ve Lökosit İnfiltrasyonunun Karşılaştırılması

Patolojik incelemede ödem, fibrozis, konjesyon ve lökosit infiltrasyonu yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde skorlanmış ve sonuçlar Tablo 9’da özetlenmiştir.

Akciğer dokusunda ödemi olmayan (“0” derece) sıçan sayısı Grup P (% 11,1) ve M’de (% 20) Grup N’ye (% 72,7) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azdı (Grup P için $p=0,02$ ve Grup M için $p=0,04$). MKH verilen grupta, ödemi olmayan sıçan sayısı (% 50) açısından Grup N’ye göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. 1. derece ödemi olan sıçan sayısı Grup P (% 77,8), M (% 80) ve V’de (% 75) Grup N’ye (% 9) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazlaydı (Grup P için $p=0,007$, Grup M için $p=0,004$ ve Grup V için $p=0,013$). MKH verilen grupta, 1. derece ödemi olan sıçan sayısı (% 50) Grup N’ye göre artmış olmakla birlikte bu fark anlamlı bulunmadı. 2. derece ödemi olan sıçan sayısı açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Akciğer dokusunda konjesyonu olmayan sıçan sayısı Grup N’de en fazla (% 27,3) olup bu fark anlamlı değildi. 1. ve 2. derece konjesyon gelişimi açısından gruplar arasında fark bulunmadı ($p=0,15$).

Akciğer dokusunda lökosit infiltrasyonu olmayan sıçan sayısı Grup P (% 55,6) ve V’de (% 25) en azdı. MKH verilen grupta, lökosit infiltrasyonu olmayan sıçan sayısı (% 75) Grup N’ye (% 81,8) benzer şekilde fazlaydı ($p>0,05$). 1. derece lökosit infiltrasyonu olan sıçan sayısı Grup V’de (% 75) en fazlaydı ve normoksi gruplarıyla karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,04$). MKH verilen grupta, 1. derece lökosit infiltrasyonu olan sıçan sayısı (% 25) açısından Grup N’ye göre (% 18,2) fark yoktu. 2. Derece lökosit infiltrasyonu olan sıçan sayısı açısından gruplar arasında fark yoktu ancak, plasebo verilen grupta az da olsa yüksekti (% 11,1).

Hematoksilen-eosin ile fibrozis açısından yapılan incelemede grupların hiçbirinde fibrozis izlenmedi.

Tablo 9. Ödem, fibrozis, konjesyon ve lökosit infiltrasyonunun 0, 1, 2 derece olmasının gruplara göre dağılımı

	SKOR	GRUP N n (%)	GRUP S n (%)	GRUP P n (%)	GRUP M n (%)	GRUP V n (%)	GRUP MKH n (%)	P
ÖDEM	0	8 (72,7)	8 (72,7)	1 (11,1)*	2 (20)*	2 (25)	4 (50)	0,004
	1	1 (9,1)	3 (27,3)	7 (77,8)♦	8 (80)♦	6 (75)♦	4 (50)	
	2	2 (18,2)	0	1 (11,1)	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
FİBROZİS	0	0	0	0	0	0	0	
KONJESYON	0	3 (27,3)	0	0	0	0	1 (12,5)	0,15
	1	7 (63,6)	11 (100)	6 (66,7)	10 (100)	7 (87,5)	4 (50)	
	2	1 (9,1)	0	3 (33,3)	0	1 (12,5)	3 (37,5)	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
LÖKOSİT İNFİLTASYONU	0	9 (81,8)	9 (81,8)	5 (55,6)	8 (80)	2 (25)	6 (75)	0,22
	1	2 (18,2)	2 (18,2)	3 (33,3)	2 (20)	6 (75)‡	2 (25)	
	2	0	0	1 (11,1)	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	

*: Grup P ve Grup M'nin Grup N ile karşılaştırılması (p=0,004)

♦: Grup P, Grup M ve Grup V'nin Grup N ile karşılaştırılması (p=0,004)

‡: Grup V'nin Grup N ile karşılaştırılması (p=0,04)

4.5. Myofibroblastların α -SMA Ekspresyonuna Göre Fibrozisin

Karşılaştırılması

α -SMA ekspresyonuna göre fibrozisin değerlendirilmesinde, α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığı ve bu hücrelerdeki boyanma yoğunluğu skorlanmış ve sonuçlar Tablo 10'da özetlenmiştir.

Grup P'de α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığı ve bu hücrelerdeki boyanma yoğunluğu normoksik gruplara göre daha güçlüydü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,019). Vasat ve MKH verilen gruplarda ise plasebo grubuna göre hücrelerin yaygınlık ve boyanma yoğunluğu anlamlı şekilde azalmıştı (her ikisi için p=0,004).

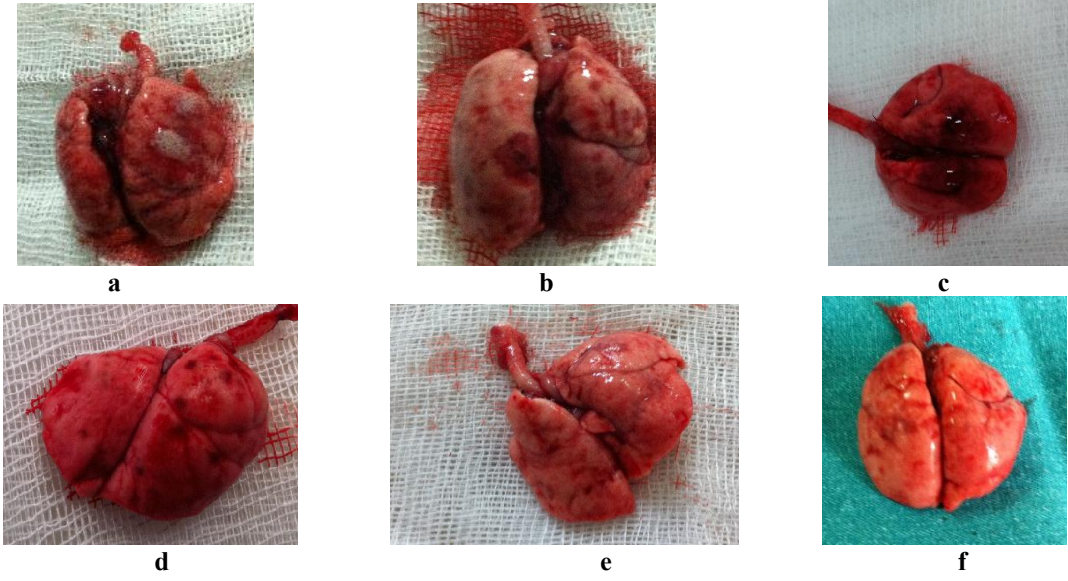
Tablo 10: α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığının ve hücrelerdeki boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması

	SKOR	GRUP N n (%)	GRUP S n (%)	GRUP P n (%)	GRUP M n (%)	GRUP V n (%)	GRUP MKH n (%)	P
α -SMA İLE BOYANMA (YOĞUNLUK VE YAYGINLIK)	ZAYIF \leq 4	11 (100)	11 (100)	4 (44,4)*	9 (90)	8 (100)	8 (100)	0,002
	GÜÇLÜ>4	0	0	5 (55,6)*	1 (10)	0	0	

*: Grup P ile diğer grupların karşılaştırılması (p=0,002)

4.6. Grupların Değerlendirilen Akciğer Dokularının Makroskopik Özellikleri

Patolojik inceleme yapılmak üzere çıkarılan akciğer dokuları kesitler alınmadan önce fotoğraflandı ve makroskopik değişiklikler kaydedildi. Hiperoksi uygulanan grupların akciğer dokusunda kanama alanları, kistik yapılar ve düzensiz akciğer doku yüzeyi izlendi (Şekil 15). Bu değişikliklerin MKH verilen grupta daha hafif olduğu dikkati çekti.



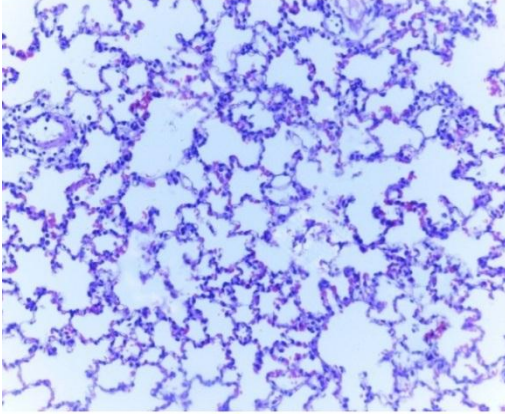
Şekil 15. A'da hiperoksi uygulanıp plasebo verilen, B'de hiperoksi uygulanıp medyum verilen ve C'de hiperoksi uygulanıp vasat verilen grupların akciğer makroskopilerinde yer yer kanama alanları, kistik yapılar ve düzensiz akciğer doku yüzeyi izlenmektedir. D'de hiperoksi uygulanıp MKH verilen grubun akciğer dokusunda kanama ve düzensizliğin daha az olduğu ve E'de sham ve F'de normoksik kontrol gruplarında normal akciğer dokusu olduğu izlenmektedir.

4.7. Grupların Değerlendirilen Akciğer Dokularının Patolojik Özelliklerinin

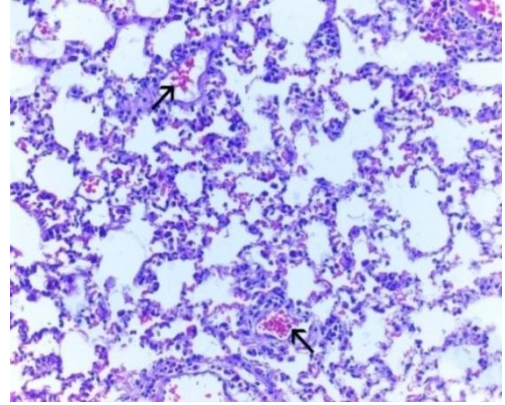
Fotoğrafları

Grup N'nin akciğer dokusunun patolojik incelenmesinde; alveol çatısının düzgün ve alveol sayısının iyi olduğu, ödem, fibrozis, konjesyon ve belirgin lökosit infiltrasyonu olmadığı izlendi (Şekil 16).

Grup S'nin akciğer dokusunun patolojik incelenmesinde düzenli yapıda akciğer parankimi olduğu ancak yer yer konjesyon alanları bulunduğu dikkat çekmişti. Ödem, fibrozis ve lökosit infiltrasyonu yoktu (Şekil 17).



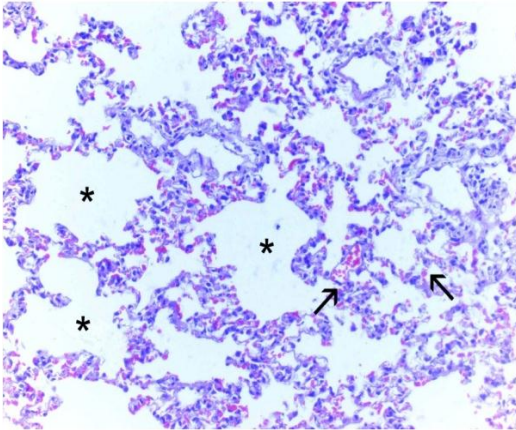
Şekil 16. Oda havası soluyan grupta (Grup N) düzenli yapıda akciğer parankimi izlendi (Hematoksilen- eozinX200).



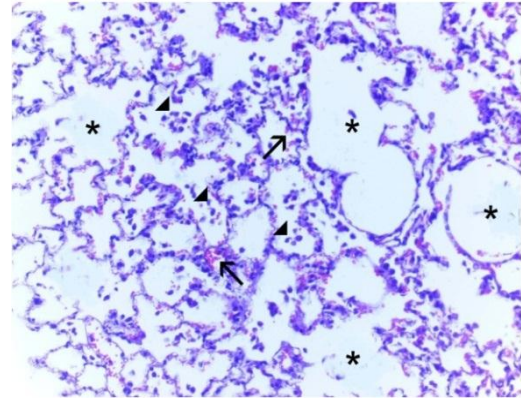
Şekil 17. Sham grubunda (Grup S) düzenli yapıda akciğer parankimin alanlarında yer yer konjesyon bulguları (ok ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).

Plasebo olarak serum fizyolojik verilen Grup P'nin akciğer çatısında bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler ve hafif derecede konjesyon bulguları olduğu izlendi (Şekil 18).

MKH'lerin üretilmesi için hazırlanan medyumun verildiği Grup M'nin akciğer çatısında bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler, hafif derecede konjesyon bulguları ve yer yer inflamatuvar hücre serpintileri olduğu izlendi (Şekil 19).



Şekil 18. Hiperoksi+plasebo grubunda (Grup P) akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli) ve hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).

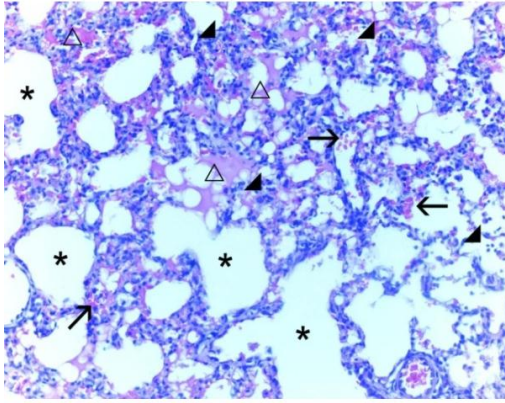


Şekil 19. Hiperoksi+medyum (Grup M) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli) ve yer yer inflamatuvar hücre serpintileri (ok ucu ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozin X200).

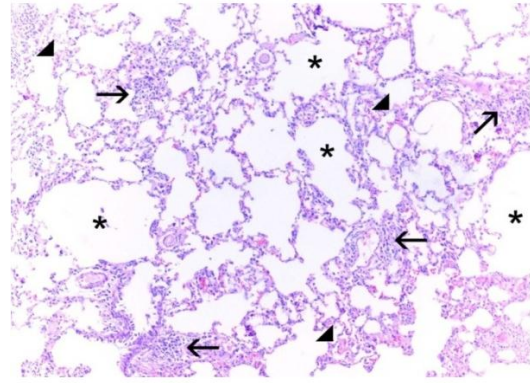
MKH'lerin üretilmesinden ve kaldırılmasından sonra kalan besiyerinin (vasat) verildiği Grup V'nin akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz

genişlemeler, hafif derecede konjesyon bulguları, inflamatuvar hücre serpintileri ve alveol lümenlerinde ödem sıvısı izlendi (Şekil 20).

MKH verilen grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler, hafif derecede konjesyon bulguları ve inflamatuvar hücre serpintileri olduğu ve bu değişikliklerin hiperoksi uygulanan diğer gruplara göre daha az olduğu izlendi (Şekil 21).



Şekil 20. Hiperoksi+vasat (Grup V) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ile işaretli), inflamatuvar hücre serpintileri (ok ucu ile işaretli) ve alveol lümenlerinde ödem sıvısı (üçgen ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).



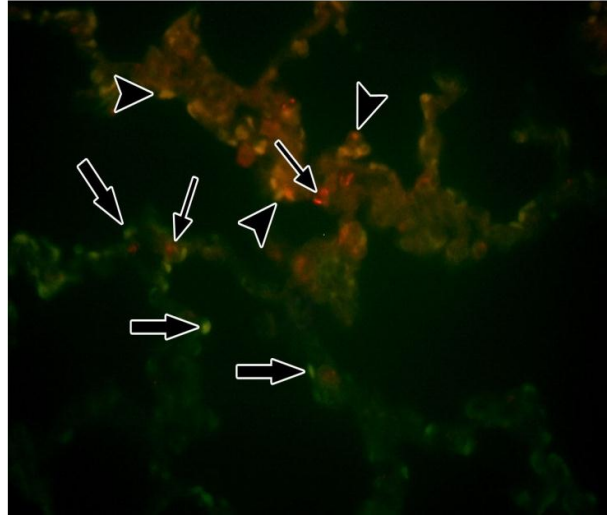
Şekil 21. Hiperoksi+MKH (Grup MKH) uygulanan grupta akciğer çatısında hafif bozulma, alveollerde yer yer amfizematöz genişlemeler (yıldız ile işaretli), hafif derecede konjesyon bulguları (ok ucu ile işaretli) ve inflamatuvar hücre serpintileri (ok ile işaretli) izlendi (Hematoksilen-eozinX200).

4.8. Mezenkimal Kök Hücre Yerleşiminin Gösterilmesi

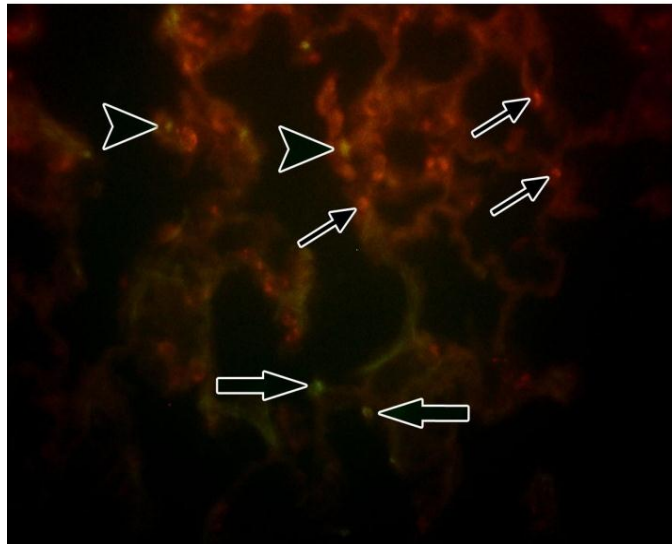
Sıçan yavrularına MKH verildikten sonra akciğer dokusunun alınmasına kadar geçen süre çok uzun olup GFP ile işaretli hücrelerin azalmış olarak izlenmesi beklendiğinden MKH verilen gruptaki sıçanlardan birer hafta ara ile üçer sıçanın akciğerleri çıkarılarak MKH yerleşimi değerlendirildi.

İşaretli hücre verilen tüm gruplarda, akciğer dokusunda GFP (+) hücrelere rastlandı. Bu hücreler tüm gruplarda sayıca az olduğu için gruplar arası sayısal karşılaştırma yapılamadı. Ancak kalitatif olarak değerlendirildiğinde en fazla pozitif hücrenin birinci hafta bitiminde akciğerleri çıkarılan grupta (Şekil 22) olduğu, süre uzadıkça GFP pozitif hücre sayısının azaldığı izlendi (Şekil 23 ve 24). MKH verilip 57. günde akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğerlerinde ise GFP pozitif hücrelerin çok az olduğu, hemen tamamen kaybolduğu saptandı (Şekil 25).

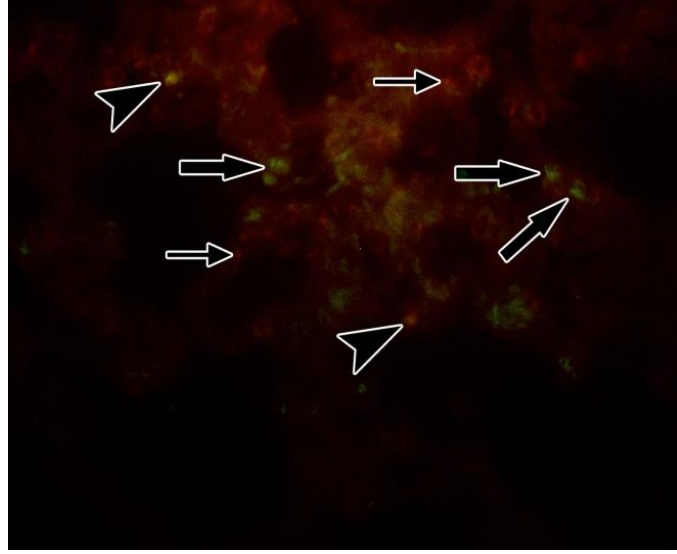
Ayrıca sürfaktan protein-C için yapılan işaretlemede tüm kesitlerde, bu proteini eksprese eden tip II pnömositler bulunmaktaydı. Yapılan ikili işaretlemenin sonuçları değerlendirildiğinde, GFP (+) hücrelerin bazılarının aynı zamanda sürfaktan protein-C'yi de eksprese ettiği gözlemlendi. Sürfaktan protein-C eksprese etmeyen GFP (+) hücrelerin akciğerin diğer tip hücrelerine dönüşüp dönüşmediği belirlenemedi. Negatif kontrol kesitlerinde GFP (+) hücreler görülmesine rağmen sürfaktan protein-C ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil 26).



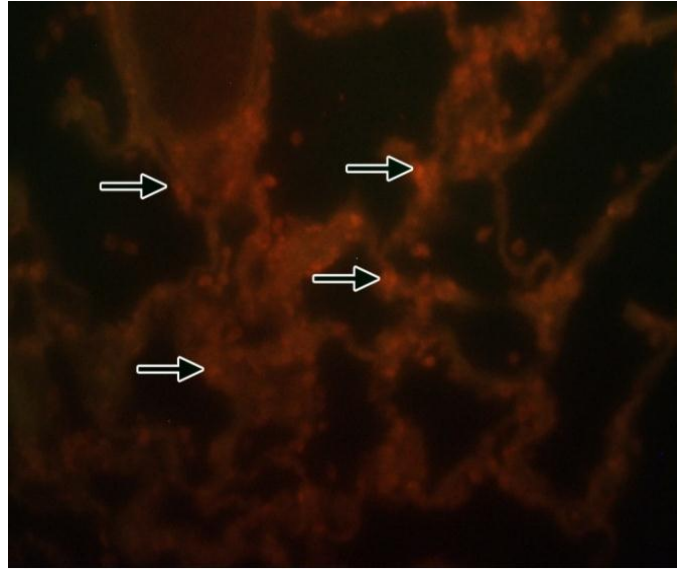
Şekil 22. MKH verilmesinden bir hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400).



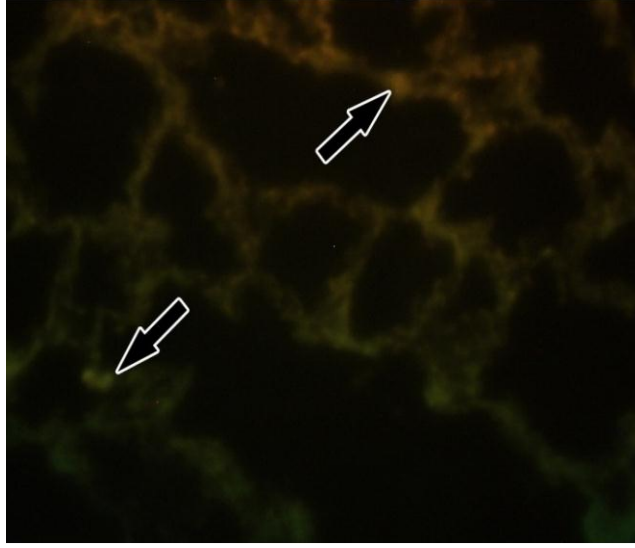
Şekil 23. MKH verilmesinden iki hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400).



Şekil 24. MKH verilmesinden üç hafta sonra akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda, GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ok başı), sadece sürfaktan protein-C (ince ok) ve sadece GFP pozitif hücreler (kalın ok) (X400).



Şekil 25. MKH verilip 57. günde akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda sürfaktan protein-C pozitif hücreler (ince ok) (X200).



Şekil 26. Negatif kontrolde GFP (+) hücreler (ok) (X200).

5. TARTIŞMA

Bonkopolmoner displazi (BPD), erken doğumun önemli bir sorunu olup erkendoğan bebeklerdeki ölüm ve sakatlıkların önde gelen nedenlerinden biridir.

BPD'nin önlenmesi kolay olmadığı gibi henüz kesin bir tedavisi de yoktur. Bu durumda mevcut tedavilere ek olarak yapılacak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Son yıllarda ilgi mezenkimal kök hücre tedavileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak alveolar hasarla giden akciğer hastalıklarında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisiyle ilgili çalışmalar çok azdır. Erişkin akciğer hasar modellerinde, kemik iliğinden türetilen hücrelerin akciğere yerleşebildiği ve çeşitli akciğer hücre fenotiplerine dönüşebildiği izlenmiştir.^{9,10} Çalışmamızda hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan sıçanlara erişkin sıçanın kemik iliğinden üretilen MKH'lerin hava yoluna verilmesinin akciğerlere etkisini histopatolojik olarak göstermeyi amaçladık. Bununla birlikte, verilen MKH'lerin akciğer dokusuna yerleşimini ve tip II alveolar epitelyal hücreye dönüşüp dönüşmediğini göstermeye çalıştık.

Güncel çalışmalar BPD'yi önleyici ve onarıcı deneysel tedaviler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla BPD modeli oluşturmada hiperoksi aracılı akciğer hasar modeli seçilmektedir. Hiperoksik akciğer hasarı mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, tedaviye yön verebilecek geniş bir bilgi birikimi ortaya çıkmıştır. Biz de çalışmamızda, sıçanlarda hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturduk. Yapılan çalışmalarda hiperoksik akciğer hasarı oluşturmada hiperoksi uygulama süresi 7, 10, 14 gün gibi çeşitlilik göstermektedir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Hiperoksiye bağlı sıçan ölümlerini en az seviyede tutarak az hayvan kullanmayı hedefledik ve çalışmamızda 10 gün hiperoksi uyguladık. Hiperoksik akciğer modelinde kullanılan oksijen yoğunluğu arasında da çeşitlilikler olup çalışmaların çoğunda % 85-95 yoğunlukta oksijen ile hasar oluşturulmuştur.^{11,27,154,155} Bir çalışmada % 75 yoğunlukta oksijen kullanılmıştır.¹⁵⁶ Çalışmamızda oksijen yoğunluğunu % 85-95 olarak belirledik. Erişkin sıçanın hiperoksiye maruziyeti sonucu akciğerlerde ödem ve kanama olabileceği bilindiğinden hiperoksi uygulaması sürecinde 24 saatte bir hiperoksiye maruz kalan anne sıçanı, aynı günlerde doğum yapmış olan ve oda havası soluyan başka bir anne sıçan ile değiştirdik. Böylece deney boyunca anne sıçan ölümünü engelledik.

Kök hücre verilmesindeki en iyi yolun ne olduğu tanımlanması gereken bir sorundur. Hiperoksi aracılı akciğer hasarı modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında kök hücreler arter, ven ve periton içine verilebilmektedir. Sistemik yolla verilen MKH'lerin hasarlı alana göç ettiği gösterilmiştir. Normal akciğerlerden farklı olarak, hasarlı akciğer dokusundan salınan faktörler MKH'lerin çoğalmasına ve hasarlı alana göç etmesine neden olurlar.¹⁵⁷ Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda trakea ve periton içine verilen MKH'lerin hasarlı alana yerleşimi karşılaştırılmış olup trakeal yolla daha fazla hücrenin akciğerlere yerleştiği gösterilmiştir.¹⁵⁸ Periton içi uygulamalarda daha fazla sayıda kök hücre gerekmektedir ve hasarlı dokuya gitme olasılığı yüksek olsa da kök hücrelerin akciğere yerleşim oranı tahmin edilemez. Yapılan bir çalışmada periton içine verilecek kök hücre miktarı 2×10^6 olarak belirlenmiştir.¹⁵⁸ Arter ve venden MKH verilmesi 10 günlük sıçan yavrularında zordur ve sağkalımı etkileyebilir. Akciğerlere direk ulaşmanın tek seçeneği hava yoluna MKH verilmesi olup bu yolla yapılacak uygulamada dokuya yerleşme olasılığının da yüksek olmasından dolayı çalışmamızda MKH'ler trakeal yolla verildi.¹¹ Bu şekilde uygulamaya karar vermede, BPD gelişimi olan erkendoğan bebeklere sürfaktan gibi etkin ve güvenli kullanımı olan bir tedavi geliştirmek fikrinden de ilham alındı. Daha önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak verilecek taze hücre kültürü sıvısı $25 \mu\text{L}$, bu sıvı içindeki kök hücre sayısı 10^5 olarak belirlendi.¹¹

Çalışmamızda altı grup oluşturduk. Oda havası soluyan normoksik sıçanlar (Grup N) kontrol grubunu oluşturdu. Trakeal yolla MKH verebilmek için cerrahi olarak orta hat boyun kesisi gerektiğinden cerrahinin sonuçlara etkisini ortadan kaldırmak üzere sadece cerrahi ve anestezi uygulanan, trakeaya iğne batırılıp çıkarılan ama ilaç verilmeyen sham grubu (Grup S) oluşturuldu. Verilecek olan MKH'ler büyüme faktörlerinin de olduğu taze hücre kültürü sıvısında (medyum) çoğaltılmaktaydı. Medyumun içindeki büyüme faktörlerinin akciğerlerde yapısal ve işlevsel değişiklikler yapabileceği bilindiğinden, bu faktörlerin etkilerini göz ardı edebilmek için hiperoksik hasar oluşturulan bir gruba sadece MKH'lerin üretileceği medyum (Grup M) verildi. MKH'lerin üretilme sürecinde bu hücrelerden salınan bazı büyüme faktörleri ve başka endojen maddelerin olduğu bilindiğinden, bu faktörlerin etkilerini göz ardı edebilmek için hiperoksik hasar oluşturulan bir gruba MKH'lerin üretilip kaldırılmasından sonra kalan hücre kültür sıvısı (vasat) verildi (Grup V). Aslam ve arkadaşlarının hiperoksik

akciğer hasarı modelini % 75 yoğunlukta oksijen kullanarak yaptığı çalışmada yenidoğan sıçan yavrularından bir gruba 50 µL hücre kültür sıvısı içinde 5×10^4 MKH, diğer gruba MKH üretilen 50 µL hücre kültür sıvısı verilmiştir. Hücre kültür sıvısı verilen grupta da MKH verilen gruba benzer şekilde akciğer yapısında düzelme izlenmiş olup bu durum, MKH'lerin ortama saldığı büyüme faktörlerine ve immün baskılayıcı etkilerine bağlanmıştır.¹⁵⁶ Hiperoksi uygulanan ve medyum, vasat ve MKH verilen grupları kendi içlerinde tedavi etkinliği açısından karşılaştırabilmek için hiperoksi uygulanıp plasebo olarak serum fizyolojik verilen plasebo grubu (Grup P) oluşturuldu. MKH grubuna ise hiperoksi sonrası 25 µL hücre kültür sıvısı içinde 10^5 hücre olacak şekilde MKH verildi.

Kök hücre tedavisinde embriyonel, nöronal, kemik iliğı, mezenkimal ve göbek kordonu kanından elde edilen kök hücreler kullanılabilir. Mezenkimal kök hücreler kolay izole edilebilmeleri, immün düzenleyici etkiye sahip olmaları ve embriyonel kök hücrelere göre teratomlara dönüşümlerinin neredeyse hiç olmaması nedeniyle çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedirler. Biz de çalışmamızda erişkin sıçanın kemik iliğinden üretilen mezenkimal kök hücreleri kullandık.

MKH'lerin trakeal yolla verilmesi sonucu akciğerde hangi alana daha fazla gideceğı veya eşit dağılıp dağılmayacağı ile ilgili bir bilgiye rastlamadık. Çalışmalarda sıklıkla sağ akciğer orta lob örnekleri alınmıştı. Bu nedenle biz de çalışmamızda incelemeler için sıçanların sağ akciğer orta lobunu aldık. Ancak sıçanların anatomik yapısında insanda olduğu gibi trakeal yolla verilen maddelerin öncelikle sağ bronşa gitmesini destekleyen bir veri bulamadık.

MKH'lerin dokuya yerleşimini gösterebilmek için transfeksiyon yöntemiyle işaretleme yapıldı. Green Flouresans Proteini (GFP) kodlayan plazmidin E.coli DH5α suşuna transforme edilerek çoğaltılması ve izole edilen kök hücrelere plazmid aktarılması sağlandı. Sıçanların akciğerleri 57. günde çıkarılacağından MKH'lerin işaretlenmesinde uzun süre dayanıklı olan bu yöntem seçildi. Bu yöntemle GFP kodlayan plazmidin sitomegalovirüse transforme edildiğı bir çalışmada transfeksiyondan iki hafta sonra GFP ekspresyonunun % 25 ve 3 hafta sonra % 10 olduğu izlenmiştir.¹⁵⁹ GFP ekspresyonunda zamanla olan bu azalma nedeniyle çalışmamızda MKH verilen 17 sıçandan sekizinin akciğerleri diğer gruplar gibi 57. günde çıkarılırken kalan dokuz sıçanın akciğerleri 10 gün hiperoksi uygulamasının

ardından birer hafta ara ile üçer sıçan alınarak çıkarıldı. MKH'lerin akciğer dokusuna yerleşimini göstermek için tip II alveolar epitelyal hücreye özgü olan sürfaktan proteini-C (SP-C) ile boyama yapıp elde edilen görüntüler kaydedildi. İşaretli MKH verilen ve 57. günde akciğerleri çıkarılan Grup MKH'de akciğer dokusunda sürfaktan protein-C pozitif hücrelere rastlandı (Şekil 25). Negatif kontrol kesitlerinde GFP (+) hücreler görülmesine rağmen sürfaktan protein-C ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil 26). Bu, görülen MKH'lerin bizim verdiklerimiz olduğunu belirtiyordu. Ancak görülen GFP (+) MKH miktarı azdı. Sıçanların akciğerleri 57. günde çıkarıldığından bu uzun süreçte hücrelerin GFP ile beklenen ışımalarının azalmış olabileceği zaten tahmin ediliyordu. 10 gün hiperoksi uygulanıp MKH verilen ve bir hafta sonra akciğerleri çıkarılan üç sıçanın akciğer dokusunda ise GFP ve sürfaktan protein-C (+) hücrelerin yerleşiminin yeterli miktarda olduğu görüldü. Ayrıca, sadece sürfaktan protein-C ve sadece GFP (+) hücreler de saptandı. MKH verildikten sonraki 2. ve 3. haftada alınan akciğer dokularında da benzer bulgular vardı, ancak GFP (+) hücre miktarının her geçen haftada daha az olduğu izlendi (Şekil 22-24). Sonuçta; işaretli hücre verilen tüm sıçanların akciğer dokusunda GFP (+) hücrelere rastlandı. Bu hücreler tüm gruplarda sayıca az olduğu için gruplar arası sayısal karşılaştırma yapılamadı. Ancak niteliksel olarak değerlendirildiğinde en fazla pozitif hücre miktarı, MKH verildikten bir hafta sonra akciğer dokusu incelenen grupta idi (Şekil 22). Süre uzadıkça GFP (+) hücre sayısının azaldığı 57. günde akciğer dokusu alınan sıçanların doku kesitlerinde GFP pozitif hücrelerin hemen tamamen kaybolduğu saptandı. Sürfaktan protein-C için yapılan işaretlemede tüm kesitlerde, bu proteini eksprese eden tip II pnömositler bulunmaktaydı. Yapılan ikili işaretlemenin sonuçları değerlendirildiğinde, GFP (+) hücrelerin bazılarının aynı zamanda sürfaktan protein-C'yi de eksprese ettiği gözlemlendi. Bu durum, verilen MKH'lerin hasarlı dokuya yerleşerek o dokunun hücrelerinin (tip II alveolar epitelyal hücre) özelliklerini aldığını göstermektedir. Verilen MKH'lerin bir kısmının tip II alveolar epitelyal hücreye dönüştüğü ve sürfaktan sentezlediği saptanmıştır. Sürfaktan protein-C eksprese etmeyen GFP (+) hücrelerin akciğerin diğer tip hücrelerine dönüşüp dönüşmediği ise belirlenememiştir.

Hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda 10. gün sonunda normoksik gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olan ağırlık kaybı saptandı. Hiperoksi aracılı akciğer hasarı oluşumu beklenen şekilde sıçan yavrularında belirgin ağırlık kaybına

neden olmuştu. 57. günde hiperoksik gruplar normoksik grubun ağırlığına ulaşmışlardı ve ağırlıkları arasında fark izlenmedi. Ancak hiperoksik gruplarda ağırlık az da olsa daha düşüktü. Hiperoksik grupların kendi arasında karşılaştırılmasında ağırlıkların hiperoksi uygulamasından ve verilen tedavilerden etkilenmemiş olduğu, 57. gündeki ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı izlendi.

Sıçanların göğüs kafesi açılıp akciğerleri çıkarıldıktan sonra kalp ve etraftaki bağ dokulardan temizlenerek yaş akciğer ağırlığı ölçüldü. Akciğer ağırlığındaki artışın ödem ve konjesyonla ilişkili olduğu bildirilmiştir.³⁴ Bizim çalışmamızda da hiperoksik gruplardan plasebo ve medyum verilen gruplarda akciğer ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı olan artış vardı. Vasat ve MKH verilen gruplarda akciğer ağırlıkları normoksik gruba yaklaşmış olup akciğer ağırlıkları arasında anlamlı farklılık izlenmedi. Vasat ve MKH tedavisinin akciğer ağırlığı üzerine olumlu etkisi olduğu bu etkinin medyum verildiğinde izlenmediği saptandı. Vasat ve MKH verilen gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında akciğer ağırlıkları açısından farklılık yoktu.

Çalışmamızda hiperoksi aracılı hasarın ve trakeal yolla MKH uygulamasının akciğerde oluşturduğu değişiklikler histopatolojik olarak değerlendirildi. Daha önceki yayınlarda patolojik değerlendirmeler birkaç parametre için yapılmış olup hiperoksik akciğer hasarının tüm patolojik değişimlerini bir arada ve niceliksel olarak değerlendiren bir evreleme sistemine rastlamadık. Çalışmamızda ışık mikroskopik düzeyde akciğer parankim çatısı, amfizem ve ödem oluşumu, nötrofil lökosit infiltrasyonu,^{146,147} fibrozis,¹⁴⁸ konjesyon ve kanama varlığı^{149,150} daha önce yapılmış çalışmalar bir araya getirilip yeniden düzenlenerek ayrı ayrı değerlendirildi. İzlenen patolojiler standardizasyonun sağlanması için numerik olarak derecelendirildi.

Hiperoksi uygulanan gruplardan sadece MKH verilen grupta alveol sayısının arttığı ve normoksi gruplarına göre (Grup N ve Grup S) farklılık olmadığı saptandı. MKH tedavisi alveol sayısını normoksik gruplardaki sayı kadar arttırmıştı. Hiperoksi uygulanıp plasebo, medyum ve vasat verilen gruplarda alveol sayısında normoksi grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı olan azalma vardı. MKH uygulanması ile elde edilen alveol sayısı artışı, vasat veya medyum uygulanmasında sağlanamamıştı.

Hiperoksi uygulanıp MKH ve vasat verilen gruplarda alveol çapının azaldığı (amfizemin düzeldiği) ve normoksi gruplarıyla (Grup N ve Grup S) farklılık olmadığı saptandı. Hiperoksi uygulanıp plasebo ve medyum verilen gruplarda ise alveol

çapındaki artış (amfizem gelişimi) normoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Hiperoksik grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında MKH verilen grupta medyum verilen gruba göre alveol çapında istatistiksel olarak anlamlı olan azalma olduğu; vasat verilen grupta medyum verilen gruba göre alveol çapında azalma olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı; vasat ve MKH verilen grupların alveol çaplarının karşılaştırılmasında farklılık olmadığı izlendi. MKH ve vasat uygulanmasının amfizem üzerine olumlu sonuçları vardı. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da hiperoksi ile azalmış septasyon ve alveol sayısı olduğu, MKH verilmesi ile alveol sayısının arttığı ve amfizemin azaldığı bulunmuştur.¹⁶⁶ Vasat verilmesi ise sadece alveol çapında azalma sağlamış, alveol sayısını arttırmamıştır.

Plasebo, medyum ve vasat verilen gruplarda, normoksik gruplara göre akciğer ödemi olmayan (ödemi “0” derece olan) sıçan sayısı daha azdı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). MKH verilen grupta ödemi olmayan sıçan sayısı normoksik gruplara benzer şekilde olup aralarında istatistiksel açıdan fark yoktu. 1. derece ödemi olan sıçan sayısı plasebo, medyum ve vasat verilen gruplarda normoksik gruplara göre belirgin olarak fazla iken MKH verilen grupta 1. derece ödemi olan sıçan sayısı açısından normoksi grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmadı. 2. derece ödemi olan sıçan sayısı açısından gruplar arasında fark yoktu. Hiperoksi uygulanması ile normoksik gruplara göre hafif-orta derecede ödem geliştiği, MKH verilmesinin ödemi azalttığı düşünüldü.

1. ve 2. derece konjesyon gelişimi açısından gruplar arasında fark bulunmadı. MKH verilmesinin konjesyona olumlu etkisi olmamıştı.

MKH verilmesi 1. derece lökosit infiltrasyonunu diğer hiperoksik gruplara göre azaltmıştı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MKH verilmesi 2. derece lökosit infiltrasyonu gelişimine olumlu etki sağlamamıştı. Vasat verilmesi de lökosit infiltrasyonunu azaltmamıştı.

BPD'nin bilinen histopatolojik bulgularından biri olan fibrozis, öncelikle hasarın onarım alanındaki yeni kan damarlarının ve gevşek ekstraselüler matriks granülasyon dokusunun etrafında ortaya çıkmaktadır. Fibrozis gelişiminde hasarlı alana fibroblast infiltrasyonu olduğu, fibroblastların myofibroblastlara dönüştüğü kabul görmektedir. Myofibroblastlar düz kas hücresi özelliği sergilerler ve α -Düz Kas Aktin (α -Smooth Muscle Actin, α -SMA) eksprese ederler. Oluşan myofibroblastlar akciğerdeki fibrozisin

gelişiminde önemli bir role sahiptir. α -SMA myojenik fibroblastları göstermede önemli bir belirteç olup fibrozisin değerlendirilmesinde kullanılır.¹⁶⁰ Kwong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada erkendoğan bebeklerin akciğerlerinde nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin TGF- β 1 kaynağı olduğu, mezenkimal kök hücrelerin antifibrotik etkisi ile ilgili çalışmalarda TGF- β 1, α -SMA ve kollojen artışına bakılarak fibrozisin değerlendirilebileceği belirtilmiştir.¹⁶¹ Xu ve arkadaşlarının sıçanların yağ doku fibroblast kültüründe retinoik asidin etkinliğini göstermek için yaptığı çalışmalarında, retinoik asidin myofibroblast farklılaşmasını ve α -SMA ekspresyonunu düzenleyici etkisini, α -SMA ile boyanmanın azalmış olarak izlenmesi şeklinde belirtilmiştir.¹⁶² Özer ve arkadaşlarının, hiperoksik akciğer hasarında retinoik asit tedavisinin etkinliğini değerlendirdikleri hayvan çalışmasında retinoik asidin fibrozisi azalttığı belirtilmiştir. Bu etkinin fibroblastların myofibroblastta farklılaşmasında azalma yoluyla olduğunu ve bunu göstermede α -SMA ekspresyonunda azalma izlenmesini kullandıklarını belirtmişlerdir.¹⁵³

Çalışmamızda hematoksilen-eosin ile yapılan incelemelerde fibrozis görülmemesine karşın immünohistokimyasal yöntemlerle myofibroblastların varlığı gösterilmiştir. Bu durum hiperoksi sonrası fibrozise eğilim olduğunu ancak hematoksilen-eosin ile boyanacak kadar fibrozis gelişmediğini düşündürmüştür. Myofibroblastların α -SMA ekspresyonuna göre fibrozisin değerlendirmesinde α -SMA eksprese eden hücrelerin yaygınlığı ve bu hücrelerdeki boyanmanın yoğunluğu zayıf ve güçlü olarak skorlanmıştır. Normoksik gruplara göre plasebo verilen grupta güçlü boyanma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Vasat ve MKH verilen gruplarda plasebo verilen gruba göre α -SMA ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır. Vasat ve MKH verilmesinin myofibroblast ekspresyonunu azalttığı kanaatine varılmıştır.

MKH'lerin akciğer hasar modellerinde kullanıldığı çalışmalarda başarılı olduğuna dair veriler olmakla birlikte aksini idda eden yayınlar da bulunmaktadır. Hennrick ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RDS nedeniyle mekanik ventilasyon uygulanan erkendoğan bebeklerin trakeal lavaj sıvısında MKH özelliği gösteren ve fibroblastlara benzeyen hücrelere rastlanmıştır. MKH izole edilen bu bebeklerde izole edilmeyenlere göre mekanik ventilatörde kalış süresi, oksijen desteği gereken gün sayısı ve BPD sıklığı artmış olarak izlenmiştir.¹⁶³ Popova ve arkadaşlarının, BPD gelişme olasılığı olan erkendoğan bebeklerin trakeal lavaj sıvısında MKH'lerin rolünü inceledikleri

çalışmasında MKH'lerin mRNA'sının kendiliğinden myofibroblast projenitör hücre belirteçlerini kodladığı gösterilmiştir.¹⁶⁴ Bir başka bulgu ise yenidoğanın akciğerlerindeki MKH'lerin insan kemik iliği türevi MKH'lerinden farklılık göstermesidir. Yenidoğan MKH'lerinin aksine insan kemik iliği türevi MKH'lerinin TGF- β 1'e yanıt olarak myofibroblastik dönüşümü azdır ve profibrotik uyarılar için esnek hatta antifibrotik faktörleri üretme yeteneğinde olabilir. Bu durum kemik iliği türevi MKH'lerin akciğer hasar modellerinde tedavi edici sonuçları sergilemesini açıklayabilir.¹⁴³

Sonuç olarak bu çalışma ile yenidoğan sıçanlarda oluşturulan hiperoksik akciğer hasar modelinde trakeal yolla sıçan kemik iliğinden üretilen MKH verilmesinin akciğer ağırlığını azalttığını, alveol sayısını arttırdığını, gelişmiş olan amfizemi hafiflettiğini ve myofibroblastların α -SMA ekspresyonunu azalttığını saptadık. Ayrıca verilen işaretli MKH'lerin hasarlı akciğere yerleşerek akciğer dokusunun hücrelerine benzediğini ve sürfaktan sentezlediğini gösterdik. Ancak MKH tedavisinin uzun süreçteki sonuçlarını ve akciğerin destek dokularındaki kayıplara olumlu etkisinin olup olmadığını değerlendiren çalışmalara ihtiyaç vardır. Olası tümör riski akılda tutulmalıdır. İyileşme arayışındaki çaresiz hastalar yaşam kalitesini arttırıcı yeni tedavileri umutla beklemektedir. Ancak kök/projenitör hücrelerle ilgili daha çok bilgiye ihtiyaç olup klinik öncesi kısa ve uzun dönemde etkinlik ve güvenlikle ilgili çalışmalar klinik çalışmaların hızını arttıracaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Hiperoksi uygulanan sıçanların hiperoksi uygulaması bitimindeki vücut ağırlıklarının oda havası soluyan gruplara göre azalmış olduğu bulunmuştur.

2. Hiperoksi uygulanıp plasebo ve medyum verilen grupların akciğer ağırlıklarının normoksi grubuna göre artmış olduğu, vasat ve MKH verilen gruplarda ise akciğer ağırlıklarının normoksik gruba yaklaşmış olduğu bulunmuştur.

3. MKH verilen grupta alveol sayısının arttığı ve normoksi grubuna yaklaşmış olduğu saptanmıştır.

4. MKH verilen grupta alveol çaplarının azaldığı (amfizemin düzeldiği) ve normoksi grubuna yaklaşmış olduğu saptanmıştır.

5. Hiperoksi uygulanması ile normoksik gruplara göre hafif-orta derecede ödem geliştiği, MKH verilmesinin ödemi azalttığı saptanmıştır.

6. MKH verilmesi 1. derece konjesyonu diğer hiperoksik gruplara göre azaltmış ancak, ağır (2. derece) konjesyona olumlu etkisi olmamıştır.

7. MKH verilmesi 1. derece lökosit infiltrasyonunu diğer hiperoksik gruplara göre azaltmış ancak, 2. derece lökosit infiltrasyonu gelişimine olumlu etki sağlamamıştır.

8. Vasat ve MKH verilen gruplarda plasebo verilen gruba göre α -SMA ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır. Vasat ve MKH verilmesinin myofibroblast ekspresyonunu azalttığı kanaatine varılmıştır.

9. İşaretli MKH verilen grupların akciğer dokularında sürfaktan protein-C pozitif hücrelere rastlanmıştır. Negatif kontrol kesitlerinde GFP (+) hücreler görülmesine rağmen sürfaktan protein-C ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu, görülen MKH'lerin bizim verdiklerimiz olduğunu belirtmektedir. Süre uzadıkça GFP pozitif hücre sayısının azaldığı 57. günde akciğer dokusu alınan sıçanların akciğer doku kesitlerinde GFP (+) hücrelerin hemen tamamen kaybolduğu saptanmıştır.

10. 10 gün hiperoksi uygulanıp MKH verilen ve birer hafta ara ile akciğerleri çıkarılan sıçanların akciğer dokusunda GFP ve sürfaktan protein-C pozitif hücrelerin yerleşiminin yeterli miktarda olduğu görülmüştür. Ancak GFP (+) hücre miktarının her geçen haftada daha az olduğu izlenmiştir. Sonuçta, işaretli hücre verilen tüm sıçanların akciğer dokusunda GFP (+) hücrelerin hasarlı dokuya yerleştiği gösterilmiştir.

11. Sürfaktan protein-C için yapılan işaretlemede tüm kesitlerde, bu proteini

eksprese eden tip II pnömositler görülmüştür. Yapılan ikili işaretlemenin sonuçları değerlendirildiğinde, GFP (+) hücrelerin bazılarının aynı zamanda sürfaktan protein-C'yi de eksprese ettiği gözlenmiş olup bu durum, verilen MKH'lerin hasarlı dokuya yerleşerek o dokunun hücrelerinin (tip II alveolar epitelyal hücre) özelliklerini aldığını göstermektedir. Verilen MKH'lerin bir kısmının tip II alveolar epitelyal hücreye dönüştüğü ve sürfaktan sentezlediği saptanmıştır.

12. Sürfaktan protein-C eksprese etmeyen GFP (+) hücrelerin akciğerin diğer tip hücrelerine dönüşüp dönüşmediği belirlenememiştir.

13. Bronkopulmoner displazi çalışmalarında hiperoksik akciğer hasar modelinin yeterliliği gözden geçirilmelidir.

14. MKH tedavisinin özellikle uzun dönemdeki sonuçlarını ve akciğerin destek dokularındaki kayıplara olumlu etkisinin olup olmadığını değerlendiren çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK.** Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* **2007**; 196:147.e1-8.
2. **Smith VC, Zupancic JA, McCormick MC, Croen LA, Greene J, Escobar GJ, Richardson DK.** Trends in severe bronchopulmonary dysplasia rates between 1994 and 2002. *J Pediatr* **2005**; 146:469-473.
3. **Ober C, Hoffjan S.** Asthma genetics: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* **2006**; 7:95-100.
4. **Veness-Meehan KA.** Effects of retinol deficiency and hyperoxia on collagen gene expression in rat lung. *Exp Lung Res* **1997**; 23:569-81.
5. **Veness-Meehan KA, Bottone FG Jr, Stiles AD.** Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats. *Pediatr Res* **2000**; 48:434-44.
6. **Phinney DG, Prockop DJ.** Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the states of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* **2007**; 25:2896-2902.
7. **Stewart DJ, Zhao YD, Courtman DW.** Cell therapy for pulmonary hypertension: what is the true potential of endothelial progenitor cells? *Circulation* **2004**; 109:e172-e173.
8. **Uccelli A, Moretta L, Pistoia V.** Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **2008**; 8:726-736.
9. **Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* **2001**; 128:5181-5188.
10. **Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA.** Intrapulmonary delivery bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* **2007**; 179:1855-1863.
11. **van Haften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, Rey-Parra GJ, Galipeau J, Haromy A, Eaton F, Chen M, Hashimoto K, Abley D, Korbutt G, Archer SL, Thebaud B.** Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**; 180:1131-1142.
12. **Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY.** Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease. *N Engl J Med* **1967**; 276:357-368.

13. **Shennan AT, Dunn MS, Ohlson A, Lennox K, Hoskins EM.** Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* **1988**; 82:527-532.
14. **Jobe AH, Bancalari E.** Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:1723-1729.
15. **Jobe AH.** The new bronchopulmonary dysplasia: an arrest of lung development. *Pediatr Res* **1999**; 46: 641-643.
16. **Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R.** Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* **2008**; 371: 75-84.
17. **Mannino DM, Braman S.** The epidemiology and economics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2007**; 4:502-506.
18. **Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Abman S, Blackmon L, Jobe A.** Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* **2006**; 117:52-56.
19. **Coalson JJ.** Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* **2003**; 8:73-81.
20. **Groenman F, Ungre S, Post M.** The molecular basis for abnormal human lung development. *Biol Neonate* **2005**; 87:164-177.
21. **Coalson JJ.** Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* **2006**; 30:179-184.
22. **Parera MC, Van Dooren M, Van Kempmen M, de Krijger R, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R.** Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2005**; 288:L141-L149.
23. **deMeloo DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM.** Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1997**; 16:568-581.
24. **Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, Haworth SG.** Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2000**; 23:194-203.
25. **Burri P.** Lung development and pulmonary angiogenesis: In: Gaultier C, Bourbon JR, Post M, Eds. Lung development. *New York: Oxford University Press, 1999*:122-151.
26. **Coalson JJ.** Pathology of chronic lung disease of early infancy. In: Bland R, Coalson JJ, Eds. Lung biology in health and disease: chronic lung disease in early infancy. *New York: Marcel Dekker, 2000*: 85-124.

27. **Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, Hashimoto K, Harry G, Haromy A, Korbitt G.** Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* **2005**; 112:2477-2486.

28. **De Paepe ME, Mao Q, Powell J, Rubin SE, DeKoninck P, Appel N, Dixon M, Gundugan F.** Growth of pulmonary mikrovasculature in ventilated preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**; 173:204-211.

29. **Hislop AA, Haworth SG.** Pulmonary vasculare damage and development of cor pulmonale following hyaline membrane disease. *Pediatr Pulmonol* **1990**; 9:152-161.

30. **Grover TR, Parker TA, Balasubramaniam V, Markham NE, Abman SH.** Pulmonary hypertension impairs alveolarization and reduces lung growth in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2005**; 288:L648-L654.

31. **Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C.** Control mechanism of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* **2005**; 57:38R-46R.

32. **Stenmark KR, Abman SH.** Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Annu Rev Physiol* **2005**; 67:623-661.

33. **Asikainen TM, Waleh NS, Schneider BK, Clyman RI, White CW.** Enhancement of angiogenic effectors through hypoxia-inducible factor in preterm primate lung in vivo. *Am J Lung Cell Mol Physiol* **2006**; 291:L588-L595.

34. **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. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2005**; 289:L529-L535.

35. **Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Seedorf G, Gien J, Abman SH.** Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2006**; 291:L1068-L1078.

36. **Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA.** Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn* **2001**; 220:112-121.

37. **Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA.** Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 160:1333-1346.

38. **Hussain NA, Siddiqui NH, Stocker JR.** Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* **1998**; 29:710-717.

39. **Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie II, Truog WE.** Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics* **2000**; 106:1452-1459.

40. **Baraldi E, Filippone M.** Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* **2007**; 357:1946.
41. **Laughon M, Allred EN, Bose C, O'Shea TM, Van Marter LJ, Ehrenkranz RA, Leviton A.** Patterns of respiratory disease during the first 2 postnatal weeks in extremely premature infants. *Pediatrics* **2009**; 123:1124-1131.
42. **Marshall DD, Kotelchuck M, Young TE, Bose CL, Kruyer L, O'Shea TM.** Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants. *Pediatrics* **1999**; 104:1345-1350.
43. **Rojas MA, Gonzale A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G.** Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* **1995**; 126: 605-610.
44. **Langstone C, Kida K, Reed M, Thurlbeck WM.** Human lung growth in late gestation and in the neonate. *Am Rev Respir Dis* **1984**; 129: 607-613.
45. **Randell SH, Young SI.** Unique features of immature lung that make it vulnerable to injury. In: Bland RD, Coalson JJ, Eds. *Marcel Dekker, New Your* **2000**:377.
46. **Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, O'Shea TM, Allred EN, Karna P, Ekrenkranz RA, Boggess K, Leviton A.** Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* **2009**; 124:e450-458.
47. **Atar MA, Donn SM.** Mechanism of ventilator-induced lung injury in preterm infants. *Semin Neonatol* **2002**; 7:353-360.
48. **D'Angio CT, Maniscalco WM.** Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: pathophysiology and management strategies. *Pediatr Drugs* **2004**; 6:303-330.
49. **Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, Parker JC.** Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* **1989**; 66:2364-2368.
50. **Carlton DP, Cummings JJ, Scheerer RG, Poulain FR, Bland RD.** Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. *J Appl Physiol* **1990**; 69:577-583.
51. **Kraybill EN, Runyan DK, Bose CL, Khan JH.** Risk factors for chronic lung disease in infants with birth weights of 751 to 1000 grams. *J Pediatr* **1989**; 115:115.
52. **Garland JS, Buck RK, Allred EN, Leviton A.** Hypocarbica before surfactant therapy appears to increase bronchopulmonary dysplasia risk in infants with respiratory distress syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* **1995**; 146:617-622.
53. **Dreyfuss D, Saumon G.** Role of tidal volume, FRC and end -inspiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* **1993**; 148:1194-1203.

54. **Nilson R, Grossmann G, Robertson B.** Lung surfactant and pathogenesis of neonatal bronchial lesions induced by artificial ventilation. *Pediatr Res* **1978**; 12:249.
55. **Robertson B.** The evolution of neonatal respiratory distress syndrome into chronic lung disease. *Eur Respir J Suppl* **1989**; 3:33s.
56. **Goldman SL, Gerhardt T, Sonni R, Feller R, Hehre D, Tapia JL, Bancalari E.** Early prediction of chronic lung disease by pulmonary function testing. *J Pediatr* **1983**; 102:613-617.
57. **Thomson MA, Yoder BA, Winter WT.** Delayed extubation to nasal continuous positive airway pressure in the immature baboon model of bronchopulmonary dysplasia: lung clinical and pathological findings. *Pediatrics* **2006**; 118:2038.
58. **Van Marter LJ, Allred EN, Pagano M, Sanocka U, Parad R, Moore M, Susser M, Paneth N, Leviton A.** Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? The Neonatology Committee for the Developmental Network. *Pediatrics* **2000**; 105:1194-1201.
59. **Frank L, Sosenko IR.** Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr* **1987**; 110:9-14.
60. **Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS.** Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via cesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2002**; 103:136-139.
61. **Manar MH, Brown MR, Gauthier TW, Brown LA.** Association of glutathione-S-transferase-P1 (GST-P1) polymorphism with bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* **2004**; 24:30-35.
62. **Pagano A, Barazzone-Argiroffo C.** Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Ann NY Acad Sci* **2003**; 1010:405-146.
63. **Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS.** Hyperoxia and apoptosis in developing Mouse lung mesenchyme. *Pediatr Res* **2006**; 59:185-190.
64. **Sue RD, Belperio JA, Burdick MD.** CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *J Immunol* **2004**; 172:3868.
65. **Waheed S, D'Angio CT, Wagner CL, Madtes DK, Finkelstein JN, Paxhia A, Ryan RM.** Transforming growth factor alpha is increased during hyperoxia and fibrosis. *Exp Lung Res* **2002**; 28:261-372.
66. **Hosford GE, Koyanagi KS, Leung WI, Olson DM.** Hyperoxia increases protein mass of 5-lipoxygenase and its activating protein, flap, and leukotriene b4 output in newborn rat lungs. *Exp Lung Res* **2002**; 28:671-684.

67. Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van der Velden A, de Heer E, Hiemstra PS, Poorthuis BJ, Walther FJ. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 36 (6):782-801.
68. Habre W, Petak F, Ruchonnet-Metrailler, Donati Y, Tolsa JF, Lele E, Albu G, beghetti M, Barazzone-Argiroffo C. The role of endothelin-1 in hyperoxia-induced lung injury in mice. *Respir Res* 2006; 7:45.
69. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003; 8:39-49.
70. Fu RH, Yang PH, Chiang MC, Chiang CC. Erythrocyte Cu/Zn superoxide dismutase activity in preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonate* 2005; 88:35-41.
71. Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis and chronic lung disease: a 13 year hospital cohort study. *Pediatrics* 2009; 123:1314-1319.
72. Yoon BH, Romero R, Jun JK. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8) and the risk for the development bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:825.
73. Hannaford K, Todd DA, Jeffery H. Role of ureaplasma urealyticum in lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 81:F162.
74. Viscardi RM, Hasday JD. Role of Ureaplasma species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatr Res* 2009; 65:84R.
75. Been JV, Rours IG, Kornelisse RF. Chorioamnionitis alters the response to surfactant in preterm infants. *J Pediatr* 2010; 156:10.
76. Ozdemir A, Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23:292-306.
77. Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: A sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994; 96:796-797.
78. Ambalavanan N, carlo WA, D'Angio CT, McDonald SA, Das A, Schendel D, Thorsen P, Higgins RD. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2009; 123:1132-1141.
79. Davies PL, Spiller OB, Beeton ML, Maxwell NC, Remold-O'Donnell E, Kotecha S. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity. *Thorax* 2010; 65:246-251.

- 80. Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R.** Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* **2009**; 154:39-43.
- 81. Van der Meer, Blackwell TS, Lawrence S.** Fibroblast growth factor-10 expression through inhibition of Sp-1 mediated NF- κ B activation limits airway branching. *J Immunol* **2010**; 185:4896-4903.
- 82. Vento G, Capoluongo E, Matassa PG.** Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Med* **2006**; 32:723-730.
- 83. Ichiba H, Saito M, Yamano T.** Amniotic fluid transforming growth factor-beta1 and the risk for the development of neonatal bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* **2009**; 96:156-161.
- 84. Lovie PM, Pham C, Jang KL.** Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to consensus statement of the national institute of health. *Pediatrics* **2008**; 122:479-485.
- 85. Mailaparambil B, Krueger M, Heizmann U.** Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia. *Dis Markers* **2010**; 29:1-9.
- 86. Merrill JD, Ballard RA, Cnaan A, Hibbs AM, Godinez MH, Troug WE, Ballard PL.** Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants. *Pediatr Res* **2004**; 56:918-926.
- 87. S. Ümit Sarıcı.** Bronkopulmoner Displazi: Tanımı, Patogenezi, Epidemiyolojisi ve Patolojisinde Yeni Görüşler. *Çocuk sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* **2006**; 49: 60-70.
- 88. Goodman G, Perkin RM, Anas NG.** Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* **1988**; 112:67.
- 89. Kinsella JP, Greenough a, Abman SH.** Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* **2006**; 367:1421-1431.
- 90. Soll RF, Morley CJ.** Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**:CD000510.
- 91. Soll RF.** Synthetic surfactant for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**:CD001149.
- 92. Soll RF.** Prophylactic synthetic surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**:CD001079.
- 93. Stevens TP, Harrington EW, Blennow M, Soll RF.** Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**:CD003063.

- 94. Verder H, Albertsen P, Ebbesen F.** Nasal continuous positive airway pressure and early surfactant therapy for respiratory distress syndrome in newborn less than 30 weeks' gestation. *Pediatrics* **1999**; 103:E24.
- 95. Verder H, Robertson B, greisen G.** Surfactant therapy and nasal continuous positive airway pressure for newborns with respiratory distress syndrome. Danish-Swedish Multicenter Study Group. *N Engl J Med* **1994**; 331:1051-5.
- 96. Reininger A, Khalak R, Kendig JW.** Surfactant administration by transient intubation in infants 29 to 35 weeks' gestation with respiratory distress syndrome decreases the likelihood of later mechanical ventilation: a randomized controlled trial. *J Perinatol* **2005**; 25:703-8.
- 97. Stevens TP, Blennow M, Soll RF.** Early surfactant administration with brief ventilation vs selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for Respiratory Distress Syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **2002**:CD003063.
- 98. Stefano JL, Abbasi S, Pearlman SA.** Closure of ductus arteriosus with indomethacin in ventilated neonates with respiratory distress syndrome. Effects of pulmonary compliance and ventilation. *Am Rev Respir Dis* **1991**; 143:236-239.
- 99. Yeh TF, Luken JA, Thalji A.** Intravenous indomethacin therapy in premature infants with persistent ductus arteriosus--a double-blind controlled study. *J Pediatr* **1981**; 98:37-45.
- 100. Schmidt B, Roberts RS, Davis P.** Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* **2007**; 357:1893-902.
- 101. Schmidt B, Roberts RS, Davis P.** Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* **2006**; 354:2112-21.
- 102. Grier DG, Halliday HL.** Corticosteroids in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* **2003**; 8:83-91.
- 103. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW.** Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2009**:CD001146.
- 104. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW.** Early (<8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2009**:CD001145.
- 105. Doyle LW, Halliday HL, Ehrenkranz RA.** Impact of postnatal systemic corticosteroids on mortality and cerebral palsy in preterm infants: effect modification by risk for chronic lung disease. *Pediatrics* **2005**; 115:655-61.
- 106. Shah V, Ohlsson A, Halliday HL, Dunn MS.** Early administration of inhaled corticosteroids for preventing chronic lung disease in ventilated very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**:CD001969.

- 107. Finer NN, Barrington KJ.** Nitric oxide for respiratory failure in infants born at term or near term. *Cochrane Database Syst Rev* **2006**:CD000399.
- 108. Saugstad OD.** Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2001**; 13:147-153.
- 109. Mondal N, Bhat BV, Banupriya C, Koner BC.** Oxidative stress in perinatal asphyxia in relation outcome. *Indian J Pediatr* **2010**; 77:515-517.
- 110. Ward PA.** Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci* **2010**; 1203:53-59.
- 111. Frank L, Sosenko IR.** Undernutrition as a major contributing factor in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* **1988**; 138:725-9.
- 112. Wilson DC, McClure G, Halliday HL.** Nutrition and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child* **1991**; 66:37-8.
- 113. Wilson DC, Cairns P, Halliday HL.** Randomized controlled trial of an aggressive nutritional regimen in sick very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **1997**; 77:F4-11.
- 114. Kennedy KA.** Epidemiology of acute and chronic lung injury. *Semin Perinatol* **1993**; 17:247-52.
- 115. Oh W, Poindexter BB, Perritt R.** Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *J Pediatr* **2005**; 147:786-90.
- 116. Bell EF, Acarregui MJ.** Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**:CD000503.
- 117. Clark RH, Gerstmann DR, Null DM Jr, deLamos RA.** Prospective randomized comparison of high frequency oscillatory and conventional ventilation in respiratory distress syndrome. *Pediatrics* **1992**; 89:5-12.
- 118. Ogawa Y, Miyasaka K, Kawano T.** A multicenter randomized trial of high frequency oscillatory ventilation as compared with conventional mechanical ventilation in preterm infants with respiratory failure. *Early Hum Dev* **1993**; 32:1-10.
- 119. Morley CJ, Davis PG, Doyle LW.** Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med* **2008**; 358:700-8.
- 120. Davis PG, Henderson-Smart DJ.** Nasal continuous positive airway pressure immediately after extubation for preventing morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* **2003**:CD000143.

- 121. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, Critz A.** Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborn receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is % 85 to % 93 an acceptable range. *Pediatrics* **2008**; 121:882-889.
- 122. Cotton RB, Hazinski TA, Morrow JD.** Cimetidine does not prevent lung injury in newborn premature infants. *Pediatr Res* **2006**; 59:795-800.
- 123. Schelonka RL, Katz B, Waites KB, Benjamin DK Jr.** Critical appraisal of the role of *Ureoplasma* in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatr Infect Dis J* **2005**; 24:1033-9.
- 124. Mabanta CG, Pryhuber GS, Weinberg GA, Phelps DL.** Erythromycine for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for or colonized or infected with *Ureoplasma urealyticum*. *Cochrane Database Syst Rev* **2003**:CD003744.
- 125. Ballard HO, Anstead MI, Shook LA.** Azitromycine in the extremely low birth weight infants for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. *Respir Res* **2007**; 8:41.
- 126. Stocker R, Glazer AN, Ames BN.** Antioxydant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**; 84:5918-22.
- 127. Morris BH, Oh W, Tyson JE.** Aggressive vs. conservative phototherapy for infants with extremely low birth weight. *N Engl J Med* **2008**; 359:1885-96.
- 128. Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, Plopper CG, Abman SH.** Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2003**; 284: L964-L971.
- 129. Tourneux P, Markham N, Seedorf G, Balasubramaniam V, Abman SH.** Inhaled nitric oxide improves lung structure and pulmonary hypertension in a model of bleomycine-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**; 297 (6): L1103-11.
- 130. Choi CW, Kim BI, Hang JS, Kim EK, Kim HS, Choi JH.** Bronchopulmonary dysplasia in a rat model induced by intraamniotic inflammation and postnatal hyperoxia: morfometric aspects. *Pediatr Res* **2009**; 65: 323-327.
- 131. Lee HJ, Kim BI, Choi ES, Choi CW, Kim EK, Kim HS, Choi JH.** Effects of postnatal dexamethasone or hydrocortisone in a rat model of antenatal lypopolysaccaride and neonatal hyperoxia exposure. *J Korean Med Sci* **2012**; 27 (4): 395-401.
- 132. Javed MJ, Mead LE, Prater D.** Endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells are enriched at different gestational ages in human umbilical cord blood. *Pediatr Res* **2008**; 64:68-73.
- 133. Van Hinsbergh VW, Rabelink TJ.** FGFR1 and the bloodline of the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**; 25:883-886.

134. **Portier LA.** Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. *Vet Surg* **2005**; 34 (5):415-23.
135. **Verfaillie C.** Stem cell plasticity. *Hematology* **2005**; 10 Suppl 1:293-6.
136. **Herzog EL, Chai L, Krause DS.** Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* **2003**; 102 (10):3483-93.
137. **Martin-Rendon E, Watt SM.** Stem cell plasticity. *Br J Hematol* **2003**; 122 (6):877-91.
138. **Assmus B, Schachinger V, Teupe C.** Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* **2002**; 106:3009-17.
139. **Cutz E, Chiasson D.** Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* **2008**; 358:743-745.
140. **Wong PM, Lees AN, Louw J, Lee FY, French N, gain K, Murray CP, Wilson A, Chambers DC.** Emphysema in young adult survivors of moderate-to-severe bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* **2008**; 32:321-328.
141. **Tropea KA, Leder A, Aslam M, Lau AN, Raiser DM, Lee JH, Balasubramaniam V, Fredenburgh LE, Alex Mitsialis S, Kourembanas S, Kim CF.** Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stem cells treatment in mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol lung cell Mol Physiol* **2012**; 302 (9): L829-37.
142. **Lu P, Jones LL, Synder EY, Tuszyński MH.** Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* **2003**; 181: 115-129.
143. **Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG.** Interleukin 1 receptor antagonist mediates the inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**; 104: 11002-11007.
144. **Shim JW, Chang YS, Park WS.** Intratracheal administration of endotoxin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Yonsei Med J* **2008**; 49 (1):144-150.
145. **Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR.** Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **1998**; 275:L110-L117.
146. **Manali ED, Moschos C, Triantafillidou C, Kotanidou A, Psallidas I, Karabela SP, Roussos C, Papiris S, Armaganidis A, Stathopoulos GT, Maniatis NA.** Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulmonary Medicine* **2011**; 11:33.

- 147. Sakashita A, Nishimura Y, Nishiuma T, Takenaka K, Kobayashi K, Kotani Y, Yokoyama M.** Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) attenuates subsequent ventilator-induced lung injury in mice. *European Journal of Pharmacology* **2007**; 507:62-71.
- 148. Aschcroft T, Simpson JM, Timbrell V.** Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin pathol* **1988**; 41:467-70.
- 149. Öztürk H, Öztürk H, Büyükbayram H, Tuncer MC.** The effects of exogenous interleukin-4 on hypoxia-induced lung injury. *Pediatr Surg Int* **2006**; 22:197-201.
- 150. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJ, Streiter RM.** Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* **2002**; 110:1703-1716.
- 151. Zhang X, Zhang C, Sun Q, Li D, Luo R, Wan Z, Ye X, Liu W, Rao S, Han J.** Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats. *Chin Med J* **2011**; 124 (16):2502-2506.
- 152. Thurlbeck WM.** Measurement of pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* **1967**; 95: 52-64.
- 153. Özer EA, Kumral A, Özer E, Duman N, Yılmaz O, Özkal S, Özkan H.** Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung injury in the newborn rat. *Pediatric Pulmonology* **2005**; 39:35-40.
- 154. Jankov RP, Luo X, Campbell A, Belcastro R, Cabacungan J, Johnstone L, Frndova H, Lye SJ, Tanswell AK.** Fibroblast growth factor receptor-1 and neonatal compensatory lung growth after exposure to %95 oxygen. *Am J Crit Care Med* **2003**; 167:1554-15561.
- 155. Franco-Montaya ML, Bourbon JR, Durrmeyer X, Lorotte S, Jarreau PH, Delacourt C.** Pulmonary effects of keratinocyte growth factor in newborn rats exposed hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**; 297:L965-L976.
- 156. Aslam M, Bajeva R, Liang OD, Fernandez-Gonzales A, Lee C, Mitsialis SA, Kourembanas S.** Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**; 180:1122-1130.
- 157. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2005**; 33: 145-152.
- 158. Chang YS, Oh W, Choi SJ, Sung DK, Kim SY, Choi EY, Kang S, Jin HJ, Yang YS, Park WS.** Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplantation* **2009**; 18:869-886.
- 159. Halem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ, Tuan RS.** Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Molecular Biotechnology* **2005**; 30:9-19.

- 160. Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G.** The myofibroblasts: A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* **1998**; 22 (2):141-147.
- 161. Kwong K, Niang S, Literat A, Zhu NL, Ramanathan R, Jones CA, Minoo P.** Expression of transforming growth factor beta (TGF- β 1) by human preterm lung inflammatory cells. *Life Sci* **2006**; 79 (25): 2349-2356.
- 162. Xu G, Redard M, Gabbiani G, Neuville P.** Cellular retinol binding protein-1 is transiently expressed in granulation tissue fibroblasts and differentially expressed fibroblasts cultured from different organs. *Am J Pathol* **1997**; 151: 1741-1749.
- 163. Hennrick KT, Keeton AG, Nanua S, Kijek TG, Goldsmith AM, Sajjan US, Bentley JK, Lama VN, Moore BB, Schumacher RE, Thannickol VJ, Hershenson MB.** Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cells phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 175: 1158-1164.
- 164. Popova AP, Bozyk PD, Goldsmith AM, Linn MJ, Lei J, Bentley JK, Hershenson MB.** Autocrine production of TGF- β 1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2010**; 298:L735-L743.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Selvi GÜLAŞI
Doğum Tarihi ve Yeri	: 25.08.1975 ADANA
Medeni Durumu	: Evli
Adres	: Akkapı Mah. Dağlıoğlu Sk. No: 33, ADANA
Telefon	: 0532 393 05 42
Faks	: -
E. posta	: selvigulasi@mynet.com
Mezun Olduğu Tıp Fakóltesi	: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi
Varsa Mezuniyet Derecesi	: -
Görev Yerleri	: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Pediatri Asistanı (2001-2006) - Siirt Pervari Devlet Hastanesinde Devlet Hizmet Yüklümlülüđu Görevi (2007-2008) - Mersin Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonatoloji Bilim Dalı'nda Yandal Uzmanlık Asistanı (2009-2011) - Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonatoloji Bilim Dalı'nda Yandal Uzmanlık Asistanı (2012 Ocak ayından beri)
Dernek Üyelikleri	: -
Alınan Burslar	: -
Yabancı Dil(ler)	: İngilizce
Diğer Hususlar	: -