

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**NİTROFEN VERİLEREK KONJENİTAL DİYAFRAGMA HERNİSİ  
OLUŞTURULAN RATLARDA NAC VE D VİTAMİNİ'NİN PULMONER  
HİPOPLAZİ'YE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. SENİHA ESİN ODABAŞ**

**DANIŞMAN**  
**YRD.DOÇ.DR.NERGÜL ÇÖRDÜK**

**DENİZLİ - 2014**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**NİTROFEN VERİLEREK KONJENİTAL DİYAFRAGMA HERNİSİ**  
**OLUŞTURULAN RATLARDA NAC VE D VİTAMİNİ'NİN PULMONER**  
**HİPOPLAZİ'YE ETKİSİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 12.04.2012 tarih ve 2012TPF018 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. SENİHA ESİN ODABAŞ**

**DANIŞMAN**  
**YRD.DOÇ.DR.NERGÜL ÇÖRDÜK**

**DENİZLİ - 2014**

YRD.DOÇ.DR.NERGÜL ÇÖRDÜK danışmanlığında Dr.SENİHA ESİN ODABAŞ tarafından yapılan "Nitrofen Verilerek Konjenital Diyafragma Hernisi Oluşturulan Ratlarda NAC ve D Vitamininin Pulmoner Hipoplaziye Etkisi" başlıklı tez çalışması gün 25/06/2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof.Dr.Özkan Herek

ÜYE

Prof.Dr.Uğur Koltuksuz

ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Nergül Çördük

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım. 27.06.2014

Prof. Dr. Çınfer TURGUT  
Dekan A.  
Dekan Yardımcısı  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

7.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran, yol gösterici olup hoŐgörülerini esirgemeyen, baŐta tez danıŐmanım ve hocam Yrd. Doç. Dr. NergülÇÖRDÜK olmak üzere,uzmanlık eğitimim süresince klinik bilgi ve deneyimlerini paylaşarak, iyi bir hekim olmam için gayret sarfeden, her konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. DR.Akile BÜKE, Prof.Dr.Uđur KOLTUKSUZ ve Prof.Dr.Özkan HEREK'e, tezindeğerlendirme aŐamasında yardımlarını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Gülçin Abban'ave ekibine, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Ferda BİR ve ekibine, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mehmet ZENCİR ve ekibine, laboratuvar çalıŐmalarımnda yardımcı olan Deneý Hayvanları AraŐtırma Laboratuvarından Veteriner Hekim Barbaros Őahin'e, asistanlığım boyunca beraber çalıŐmaktan her zaman büyük keyif duyduğum, dostluk ve arkadaşlıklarını hissettiğim tüm hekim arkadaşlarıma,geçen asistanlık yılları boyunca desteklerini gördüğüm, yoğun çalıŐmalarına rağmen hiç bir zaman yüzünde tebessüm eksik olmayan kliniğimizin değerli tüm hemŐire ve yardımcı personeline, eğitimimin her aŐamasında bana sevgi, güven ve sabırla destek olan annem, babam ve abime,

Sonsuz saygı ve teŐekkürlerimi sunarım.

Dr.Seniha Esin ODABAŞ

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	V
KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET .....	XI
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1. Embriyoloji	
1.1. Diyafragma Gelişimi	
1.2. Akciğer Gelişimi	
2. Anatomi	
2.1. Göğüs Boşluğu	
2.2. Diyafragma	
2.3. Akciğerler	
3. Konjenital Diyafragma Hernisi	
3.1. Tarihçe	
3.2. Sıklık	
3.3. Etyoloji	
3.4. Eşlik Eden Anomaliler	
3.5. Embriyopatogenez	
3.6. Tanı	
3.7. Prognostik Faktörler	
3.8. Tedavi	
3.9. Gelecekteki Tedavi Seçenekleri	
4. Nitrofen	
5. N-Asetil-sistein	
6. D Vitamin	
7. TGF-β1	
8. Sürfaktan Protein A	

GEREÇ VE YÖNTEM.....	
BULGULAR .....	25
TARTIŞMA .....	35
SONUÇLAR.....	43
KAYNAKLAR .....	44
EKLER .....	54

## KISALTMALAR

- AaDO<sub>2</sub>: Alveoler-arteriyel oksijen gradiyenti  
APGAR: Appearance –pulse-grimace-activity-respiration  
DBP:D Vitamini bağlayan protein  
D<sub>2</sub>:Ergokalsiferol  
D<sub>3</sub>:Kolekalsiferol  
25(OH) D:Kalsitriol  
DPPC:Dilkolinfofatidipamitoil  
ECMO: Ekstra Korporal Membran Oksijenizasyonu  
EGF:Endotelyal büyüme faktörü  
FETENDO: Fetoscopic temporary tracheal occlusion balloon procedure  
FiO<sub>2</sub>: İnspirasyon oksijen fraksiyonu  
HFOV: Yüksek frekanslı osilatuar ventilasyon  
HFPPV: Yüksek frekanslı pozitif basınçlı ventilasyon  
HiVHV: Hiperkapniye izin veren ‘hafif’ ventilasyon  
HRP-SA:Horseradish peroksidaz konjugatı  
KDH: Konjenital Diyafragma Hernisi  
LHR:Akciğer baş oranı  
MAP: Ortalama havayolu basıncı  
Max: Maksimum  
Min: Minimum  
MVI: Modifiye ventilasyon indeksi  
NAC:N-asetilsistein  
NO:Nitrik Oksit  
OI: Oksijenizasyon indeksi  
Ort: Ortalama  
PaCO<sub>2</sub>: Parsiyel karbondioksit basıncı  
PaO<sub>2</sub>: Parsiyel oksijen basıncı

PBS:Phosphate buffered saline  
PEEP: Pozitif ekspirasyon sonu basıncı  
PIP: Pozitif inspiratuvar zirve basıncı  
PTC:Fosfatidilkolin  
PTE:Fosfatidiletanolamin  
PTG:Fosfatidilgliserol  
PTI:Fosfatidilinositol  
SP-A:Sümfaktan protein A  
TET:Tetradine  
TGF: Transforming growth factor  
TGF- $\beta$ 1:Transforming growth factor $\beta$ 1  
USG: Ultrasonografi  
VDR:Vitamin D resptörü  
VI: Ventilasyon indeksi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nitrofenin moleküler yapısı.....	16
Şekil 2.Diyafagma hernisi gelişen rat yavrusu.....	21
Şekil 3.Hematoksilen-eozin ile boyalı akciğer dokusu.....	30
Şekil 4.TGF-β1 ile boyanma.....	32
Şekil5.Sümfaktan ile boyanma.....	34

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Grupların morfolojik ölçüm değerleri.....	26
Tablo 2. Sol akciğerlerde epitel tipleri.....	28
Tablo 3. Sol akciğerlerde alveolar septal kalınlıklar.....	29
Tablo 4. Sol akciğerlerde interstisyum miktarları.....	29
Tablo 5. Sol akciğerlerde TGF- $\beta$ 1 ile boyanma düzeyleri.....	31
Tablo 6. Sol akciğerlerde SP-A ile boyanma düzeyleri.....	33
Tablo 7. Sağ akciğerlerde epitel tipleri.....	54
Tablo 8. Sağ akciğerlerde alveolar septal kalınlıklar.....	54
Tablo 9. Sağ akciğerlerde interstisyum miktarları.....	55
Tablo 10. Sağ akciğerlerde TGF- $\beta$ 1 ile boyanma düzeyleri.....	55
Tablo 11. Sağ akciğerlerde SP-A ile boyanma düzeyleri.....	56

## ÖZET

### **Nitrofen verilerek konjenital diyafragma hernisi oluşturulan ratlarda NAC ve D vitamini'nin pulmoner hipoplaziye etkisi**

Dr.Seniha Esin ODABAŞ

Konjenital diyafragma hernisi (KDH) yenidoğan yoğun bakımdaki ilerlemelere rağmen mortalitesi hala yüksek bir anomalidir. KDH'de ölümlerin en önemli sebebi, pulmoner hipoplazidir. Pulmoner hipoplazinin sebebi henüz tam aydınlatılmamış olmakla beraber multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, nitrofen ile KDH oluşturulan ratlarda, N-asetil sistein (NAC), D vitamini ve NAC ile beraber D vitamininin pulmoner hipoplaziye etkisi araştırıldı.

Çalışmada Sprague Dawley cinsi gebe ratlar kullanıldı. Ratlar, grup 1 (sham grubu), grup 2 (kontrol/nitrofen grubu), grup 3 (nitrofen+NAC grubu), grup 4 ( nitrofen+ D vitamini grubu), grup 5 (nitrofen+NAC+D vitamini grubu) olarak 5 gruba ayrıldı. Grup 2, 3, 4 ve grup 5'e gebeliğin 9,5' uncu gününde 200 mg nitrofen bir ml zeytinyağı içinde, orogastrik yol ile verildi. Grup 3'e 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 800 mg/kg'dan NAC verildi. Grup 4'e 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 1 mcg/kg'dan D vitamini ve grup 5'e 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 800 mcg/kg'dan NAC ve 1mcg/kg'dan D vitamini verildi.

Gebeliğin 21-22. gününde doğan yavru ratlara laparotomi yapıldı. Grup 1(n=8),grup 2(n=6)' den rastgele seçilen ve sol diyafragma hernisisaptanan ve grup 3(n=29), 4(n=11) ve 5(n=11)'den sol diyafragma hernisi tespit edilen yavru ratların akciğerleri çıkarıldı. Akciğerler morfolojik (vücut ağırlığı, sağ akciğer ve sol akciğer ağırlığı, akciğer / vücut ağırlığı oranı), histopatolojik (Alveolar septal kalınlık, interstisyum, epitelyal hücreler) ve immunohistokimyasal (TGF-β1 ve Sürfaktan Protein A) olarak incelendi.

Akciğerlerin morfolojik incelenmesinde istatistiksel olarak vücut ağırlığı, sağ akciğer ağırlığı yönünden anlamlı fark bulunmadı( $p>0,05$ ).Sol akciğer, akciğer / vücut ağırlığı oranına bakıldığında grup 2'de diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı düşüklük görüldü ( $p<0,05$ ).

Akciğerlerin histopatolojik incelenmesinde, gruplar arasında epitel tipi, septal kalınlık ve interstisyum miktarı açısından anlamlı farklılık mevcuttu ( $p<0,05$ ). Grup 2'de epitel tipi diğer gruplara nazaran daha immatür idi. Septal kalınlık grup 2'de diğer gruplara oranla anlamlı olarak artmıştı ( $p<0,05$ ). İnterstisyum miktarı grup 2'de diğer gruplara göre anlamlı azalmıştı ( $p<0,05$ ).

TGF- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1) antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal incelemede grup 1'de hiç boyanma izlenmedi. Grup 2' de diğere gruplara oranla artmış boyanma izlendi. Grup 4 'te ise grup 3 ve 5 'e oranla artmış boyanma izlendi( $p<0.05$ ).Grup 3 ve 5 arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Akciğereilerin SP-A (sümfaktan protein A) ile yapılan immünohistokimyasal incelenmesinde grup 1' de artmış boyanma izlendi. Grup 2'de boyanma izlenmedi ya da zayıf boyanma tespit edildi. Grup 3, 4 ve 5'te ise grup 2'ye göre boyanma daha fazla idi ( $p<0,05$ ). Grup 3 ve 4 arasında anlamlı farklılık yok idi. Grup 5'te grup 3 ve 4'e oranla boyanma artmıştı.

Nitrofen ile KDH oluşturulan ratlarda, prenatal dönemde verilen D vitamininin pulmoner hipoplaziyi azalttığı, ancak tek başına kullanımının, etkinliği daha önce yapılan çalışmalarla da gösterilmiş olan NAC'a bir üstünlüğünün olmadığı görülmüştür. D vitamini ve NAC'ın birlikte kullanımınınayrı ayrı kullanımlarına göre üstünlüğü, histopatolojik veTGF- $\beta$ 1 düzeyleri sonuçlarında görülmemiş olmakla birlikte SP-A düzeylerindeki artış birlikte kullanımın daha etkili olduğu yönündedir. Bu sonuçlardaki farklılık nedeniyle her iki ajanın birlikte kullanımının daha etkili olduğu söylenememekle birlikte SP-A düzeylerindeki bu artışın anlamlı olup olmadığı başka çalışmalarla desteklenmelidir.

### **Anahtar Kelimeler:**

Konjenital diyafragma hernisi, rat, nitrofen, N-asetil-sistein, D vitamini

## ABSTRACT

### **Effects of NAC and vitamin D to pulmoner hypoplasia of nitrofen-induced diaphragmatic hernia rat model**

Dr.Seniha Esin ODABAŞ

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is an anomaly, the mortality of which is still high despite the advancements in the neonatal/newborn intensive care unit. The most important cause of deaths in CDH is the pulmonary hypoplasia. The cause of pulmonary hypoplasia, although not yet totally clarified, is thought to be multifactorial.

In this study, the effect of N- acetil (NAC), Vitamin D and also the effect of Vitamin D with NAC on pulmonary hypoplasia was studied in the rats with nitrofen induced CDH.

In this study, pregnant rats of Sprague Dawley were used. Rats were divided into 5 groups as group 1 (group sham), group 2 (control: group nitrofen), group 3 (group nitrofen+NAC), group 4 (group nitrofen+ Vitamin D) and group 5 (group nitrofen+NAC+ Vitamin D). Groups 2, 3, 4 and 5 were given 200 mg of nitrofen in 1 ml olive oil through the orogastric administration on the gestational day 9,5. Starting from the 16th day, group 3 was given 800 mg/kg NAC through the subcutaneous injection for 4 days. Group 4, on the other hand, was given 1 mcg/kg Vitamin D through the subcutaneous injection for 4 days, starting from the 16th day, while group 5 was given 800 mcg/kg NAC and Vitamin D through the subcutaneous injection for 4 days, starting from the 16th day. Laparotomy was performed on the rats born on the 21st-22nd gestational days. The lungs of the newborn rats which were randomly selected from group 1 (n=8) and group 2 (n=6) and in which left diaphragmatic hernia was determined were excised along with the lungs of the newborn ones selected from group 3 (n=29), Group 4 (n= 11) and group 5 (n=11) in which left diaphragmatic hernia was determined, as well. The lungs were morphologically (body weight, weights of right and left lungs, lung / body weight ratio), histopathologically (Alveolar septal thickness, interstitium, epithelial cells ) and immunohistochemically (TGF- $\beta$ 1 and surfactant Protein A) examined.

In the morphological examination of the lungs, no statistically significant difference was found in terms of body weight, and the weight right lungs. ( $p>0,05$ ). Considering the left lung weight, lung weight/ body weight ratio, group 2 was seen to be statistically significant lower when compared to other groups. ( $p<0,05$ ).

In the histopathological analysis of the lungs, the difference among the groups in terms of alveolar thickness, pulmonary epithelial type and interstitium was found to be significant ( $p < 0,05$ ). Epithelial in group 2 were immature than the other groups. Septal thickness in group 2 were significantly higher compared to other groups ( $p < 0.05$ ). The amount of interstitium in group 2 was significantly decreased compared to other groups ( $p < 0.05$ ).

In the immunohistochemical analysis performed through the TGF- $\beta$ 1 antibody, no staining was observed in group 1 at all. In group 2, however, an increased staining was observed in comparison to the other groups. In group 4, on the other hand, an increased staining was observed when compared with groups 3 and 5 ( $p < 0.05$ ). No significant difference was determined between groups 3 and 5.

In the immunohistochemical analysis of the lungs that was performed through the surfactant Protein A, an increased staining was observed in group 1. In group 2, however, no staining was observed or a slight staining was identified. On the other hand, staining in groups 3, 4 and 5 was more than that in Group 2 ( $p < 0,05$ ). There was no significant difference between groups 3 and 4. The staining had increased in group 5 when compared to groups 3 and 4.

In the rats with CDH induced by nitrofen, it was seen that Vitamin D given during the prenatal period had reduced the pulmonary hypoplasia, yet, its application alone was not superior to NAC, the efficiency of which was put forth through the previous studies conducted. Even though the superiority of the use of Vitamin D and NAC together to their separate applications was not seen in the histopathological results and the results of the TGF- $\beta$ 1 levels, the increase in the surfactant A levels suggests that their combined administration is more efficient. Due to the difference in these results, it cannot be said that the combined use of both of the agents is more efficient; yet, whether this increase in the surfactant A levels is significant or not should be supported by some other studies.

**Key Words:** Kongenital diaphragmatic hernia, rat, nitrofen, N-asetil-sistein, vitamine D

## GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital Diyafragma Hernisi (KDH) , 2000 -5000 canlı doğumda bir görülen ve mortalitesi yüksek olan bir anomalidir (1). Çoğunlukla diğer konjenital anomalilerle birliktelik gösterir. KDH ile doğan yenidoğanlarda genellikle akciğer hipoplazisi ve persistant pulmoner hipertansiyon nedeniyle ciddi respiratuvar distress sendromu görülür (1). KDH'li yenidoğanlarda ölümlerin en önemli sebebi, herni gelişen tarafta daha belirgin olmak üzere iki taraflı pulmoner hipoplazi ve pulmoner hipertansiyondur. Pulmoner hipoplazinin patogenezi ise halen tam olarak bilinmemektedir (2).

Yapılan araştırmalarda gebe ratlara nitrofen verilerek KDH oluşturulmuş yavru ratlarda akciğer hipoplazisi ve immatüritesinin, insan modellerine benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (1). KDH oluşturulmuş ratların akciğerlerinde bronşial dallanmada ve pulmoner damarlanmada azalma, az differansiye pulmoner epitel ve alveolar gelişimde gerilik tespit edilmiştir (3). KDH'da görülen yetersiz akciğer gelişimin büyük ölçüde düzensiz damarlanma ve görülen sürfaktan direncinin de büyük ölçüde az differansiye pulmoner epitel ile ilgili olduğu gösterilmiştir (4). Bu süreçte çeşitli büyüme ve anjiogenetik faktörlerin etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca azalan sürfaktan protein A düzeylerinin az differansiye pulmoner epitel ile ilişkisi belirtilmiştir.

Günümüzde KDH prenatal olarak saptanabilmektedir. Bu da araştırmaları prenatal tedavi şekilleri üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu konuda yapılan deneysel çalışmalarda çeşitli yöntemlerle KDH oluşturulmaya çalışılmıştır. Deneysel olarak KDH oluşturmak amacıyla en çok nitrofen ile oluşturulan yöntem kullanılmaktadır (9). Nitrofen ile KDH oluşturulan hayvan modellerinde çeşitli ajanlar prenatal dönemde verilerek akciğer maturasyonu, büyüme faktörlerine etkileri ve genetik çalışmalar yapılmıştır (6,7).

NAC mukolitik bir ajandır. Etkisini balgam içerisindeki disülfür yapısındaki mukoproteini parçalayarak, endotel ve bronşial epitelyum hücrelerinde adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin üretimini regüle ederek gösterir. NAC'ın pulmoner fibrozis, akciğer yaralanması, kronik obstruktif akciğer hastalığı, kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda klinik faydaları gösterilmiştir (7,8).

1.25-dihidroksi D vitamini solunum fonksiyonları üzerine etkilidir. Matriks metalloproteinazlarını ve fibroblast çoğalmasını engelleyerek kollajen sentezini etkiler ve akciğer dokusunun yeniden modellenmesini sağlar (9).

TGF- $\beta$ 1; TGF- $\beta$  süper ailesinin bir üyesidir. TGF- $\beta$  ailesinin 3 sub grubu bulunur. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 1; 309 aminoasit içerir. TGF- $\beta$ 1'in bağışıklık sistemi ve hücre

remodilazasyonunda önemli bir rolü vardır. TGF- $\beta$ 1 apoptozisi sağlar ve gelişmekte olan bir hücrede hücre farklılaşmasına yol açar. Ayrıca bağışıklık sisteminde de rol oynar (10).

SP-A alveoler tip 2 hücreleri tarafından salgılanan bir lipoproteindir ve dört adet surfaktan proteini içinde en sık görülendir. Molekül ağırlığı 28-36 kDa arasında değişir. Alveolar hava boşluğunda yüzey gerilimini azaltarak akciğer periferinde ventilasyonun rahatlamasını sağlar. Alveolar makrofajlarda oksijen radikallerinin üretimini uyararak distal hava yollarında bakterilerinin temizlenmesine katkıda bulunur ve aynı zamanda makrofaj göçünü de artırır. Glukokortikoidler, epidermal büyüme faktörleri ve tiroid hormonları da SP-A düzeyini artırır (11).

Çalışmamızda prenatal NAC ve D vitaminin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının akciğer hipoplazisini azaltmaya yönelik etkisi değerlendirilmiştir. Akciğerler, morfolojik (vücut ağırlığı, sağ akciğer ve sol akciğer ağırlığı, akciğer / vücut ağırlığı oranı), histopatolojik (Alveolar septal kalınlık, interstisyum, epitelyal hücreler) ve immunohistokimyasal (TGF- $\beta$ 1 ve SP-A) olarak incelenmiştir.



## GENEL BİLGİLER

### 1.EMBRİYOLOJİ

#### 1.1.Diyafragma

Diyafragmanın embriyolojik gelişimi iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak diyafragmatik primordium oluşur. İkinci olarak pleuroperitoneal kanalın kapanması ile plevral kavite oluşur (12).

Diyafragmatik primordiumun gelişmesi embriyogenezisin ilk dört haftası içinde gerçekleşir. Primitif diyafragma üç kısımdan oluşur. Bu kısımlar; transvers septumun ventral kısmı, pleuroperitoneal kanalın kaudal kısmı ve posthepatik mesenşimal plaktır (13).

#### 1.2.Akciğerler

Akciğerlerin gelişimi beş evreye ayrılır. Bunlar; embriyonik, pseudoglanduler, kanaliküler, sakküler ve alveolar evrelerdir (14).

Embriyonik evre; gestasyonun üçüncü haftasında başlar. Akciğerler foreguttan gelişmeye başlar. Gestasyonun dördüncü haftasında trakeal tüberkülün sefalokaudal yönde büyümesi ile trakea ve her iki akciğer tomurcuğu gelişmeye başlar. Altıncı haftadan itibaren akciğer tomurcuklarında lobar yapılar görülür (14).

Psödoglandüler evre; gestasyonun 7-16'ncı haftalar arasındaki dönemdir ve bu dönemde akciğer hava yolları farklılaşır.

Kanaliküler evre; gestasyonun 16-24'üncü haftaları arasında meydana gelir. Bu dönemde alveoller kabaca şekillenmeye başlar. Tip 1 pnömositler farklılaşmaya başlar. Sürfaktan üretimine yanıt olarak tip 2 pnömositlerin öncüleri görülür (14,15).

Sakküler dönem; gestasyonun 24. haftasından doğuma kadar olan süreyi kapsar ve bu dönemde alveolar maturasyon devam eder. Bu dönem boyunca hava yollarının farklılaşması yanında, sürfaktan sentez yeteneği de gelişmeye devam eder.

Alveolar evre; doğumdan 8 yaşına kadar devam eder. Matür alveoller doğumdan kısa bir süre sonra görülmeye başlar. Alveollerin gelişimi ve çoğalmaları doğumdan sonra da devam ederek sekiz yaşına kadar sürer. Alveolleri birbirine bağlayan Kohn gözenekleri 1 yaşında ve alveolleri büyük hava yollarına bağlayan Lambert kanalları 5 yaşında oluşmaya başlar (15).

Akciğerler basıya uğrarsa gelişimi engellenir. KDH' lı hastalardaki en önemli patoloji ve mortalitedeki en önemli neden, pulmoner hipoplazi ve sonrasında gelişen pulmoner hipertansiyondur (14). Gelişen persistant pulmoner hipertansiyonun fizyopatolojisinde, pulmoner arter ve akciğerin periferik arterlerinin muskuler tabakalarında meydana gelen

kalınlaşmanın rol oynadığı gösterilmiştir (16). Bununla beraber mevcut damarsal anomalilerin nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

## **2. ANATOMİ**

### **2.1. Göğüs Boşluğu**

Toraks, kemik ve kıkırdaktan oluşan, solunum ve dolaşım organlarını koruyan, tepesi koni şeklinde önden arkaya biraz basık bir yapıdır (17).

Göğüs kafesinin ön bölümünü, sternum ve kaburgaların ön yarıları ve kıkırdak kısımları oluştururken arka bölümünü ise tüm torakal vertebralar ve kaburgaların arka yarıları oluşturur. Kaburgaların arasında kalan bölgeye interkostal aralıklar denir ve buralarda interkostal damarlar, kaslar ve membranlar bulunur. Göğüs kafesinin girişine 'apertura torasica superior' , çıkışına ise 'apertura torasica inferior' denir. Diyafragma, apertura torasica inferioru sınırlayan yapılara tutunur. Diyafragma sağ tarafta 5. kıkırdak kaburgaya sol tarafta ise 6. kıkırdak kaburgaya kadar uzanır. Göğüs boşluğunun büyük kısmını akciğerler doldurur. İki akciğer arasındaki yere mediastinum denir ve burada kalp bulunur (17,18).

### **2.2. Diyafragma**

Diyafram karın ve göğüs boşluklarını birbirinden ayıran kubbe şeklinde kas ve tendonlardan oluşmuş anatomik bir yapıdır. Yapısında yer yer fibröz ve yer yer de müsküler dokular içerir. Diyaframanın müsküler kısmı, 'pars sternalis diyafragmatis', 'pars kostalis diyafragmatis' ve 'pars lumbalis diyafragmatis' olmak üzere üç bölüme ayrılır (18,19).

Sternal kısım, ksifoidin arka yüzünden iki müsküler bant şeklinde başlar. Kostal kısım, son altı kaburganın kıkırdakları ve yakın kemik bölümlerinden başlayarak transversus abdominis adelesiyle birleşerek sonlanır. Lumbal kısım, tendinöz yapılardan oluşur ve bu yapılar sağ ve sol krus olarak adlandırılır. İki krus hiatus aortikus çevreler. Diyaframanın üç bölümü de ortada bulunan sentrum tendineumda sonlanır. Sentrum tendineum, diyafragma kubbesinin ortasında ince fakat kuvvetli liflerin birleşmesi sonucu oluşan bir yapıdır (19).

### ***Diyaframadaki Geçitler***

Diyaframada üç adet damar ve organların geçtiği açıklık bulunur. Hiatus aortikus, bu üç deliğin en arkada ve altta olanıdır. Birinci lumbal vertebra ile diyafragma krusları arasındadır. İçerisinden aorta, vena (v.) azigos ve duktus torasikus geçer (17,18).

Hiatus özofagus ise 10. torakal vertebra hizasında ve diyafragmanın musküler kısmı içindedir. İçerisinden özofagus, sağ ve sol nervus (n.) vagus, a. ve v.gastrika sinistra'nın özofajial dalları ve özofagusun alt 1/3'ünü drene eden lenf damarları geçer(17,18).

Foramen v. cava, en yukarıda bulunan deliktir ve 9. -10. torakal vertebralar arasındaki hizada bulunur. Bu delikten v. cava inferior ve diyafragmanın innervasyonunu sağlayan sağ n. frenikus geçer(17,18,19).

### **2.3.Akciğerler**

Akciğerler mediastinumun her iki yanında yer alırlar ve göğüs boşluğunda en büyük yeri işgal ederler.

Akciğerler süngerimsi elastik bir yapıya sahiptir. Yenidoğanda akciğerlerin rengi pembemsi beyazdır. Yaş ilerledikçe gri renk alır. Akciğerlerin ağırlığı, erkeklerde vücut ağırlığının yaklaşık 1/37'si, kadınlarda ise 1/43'ü kadardır(17).

Akciğerlerin şekli koniye benzer. Akciğerlerin 4 yüzü vardır. Bu yüzler kostalar, mediastinum, diyafragma ve loblar arasındadır. Akciğerlerin tabanına 'fasies diyafragmatika' denir ve diyafragma kubbesine uygun olacak şekilde konkavdır (18).

Akciğerler loblardan oluşmuştur. Sağ akciğer üç lobdan oluşmuştur ve bu lobları birbirinden oblik ve horizontal fissürler ayırır. Sol akciğer ise oblik fissür ile birbirinden ayrılan iki lobdan oluşmuştur (18).

Radiks pulmonalis içerisinde, akciğere giren ve çıkan yapılar olan bronkuslar, a. ve v.pulmonalis, lenf damarları, a. bronşiyalis ve sinirler bulunur. Akciğerler segmental bronşlarla, fonksiyonel birimler olan segmentlere ayrılır (17).

Akciğerler dıştan içe doğru üç yapıdan oluşur. Seroza, subseroza ve parankimadan oluşur. Akciğerleri saran serozaya visseral plevrada denir (17).

Akciğer parankiminde fonksiyonel birimler, respiratuvar bronşiyol, duktus alveolaris, kan damarları, lenf damarları ve sinirlerden oluşur. Respiratuvar bronşiyollerin dallanması ile duktus alveolarisler oluşur ve bunlar 'alveolis pulmonalis' denilen keselerle sarılmıştır. Komşu alveollerde 'septum interalveolaris' denilen bölümlerle birbirlerinden ayrılırlar. Alveollerde gaz alışverişi yapılıdır (17,18).

### ***Damar ve Sinir Yapıları***

Akciğerin iki grup damarı vardır. Birinci grup olan a. ve v. Pulmonalis'ler fonksiyonel damarları, ikinci grup olan a. ve v. Bronşiyalisler ise besleyici damarları oluşturur (18).

Akciğerler sempatik ve parasempatik liflerin oluşturduğu sinir ağından innerve olur. Sempatik ve parasempatik lifler içinde duyular merkeze iletilir. Visseral plevrada, bronşlarda, bronşiyollerde ve alveoller arasında uyarıları alan reseptörler bulunur. Sempatik etki bronşları genişletip damarları daraltırken parasempatik etki tam tersini yapar (18).

### **3.KONJENİTAL DİYAFRAMA HERNİSİ**

#### **3.1.Tarihçe**

KDH ile ilgili ilk tanımlamalara 1754 tarihinde McCauley'in "Proceedings of the Royal Colege of Physicians" dergisinde rastlanmaktadır. Coopel ve Laennec klinik tanımlamalarla beraber patolojiyi 1834'de tarif etmişlerdir. Bowditch 1847'de hasta başında ilk kez tanı koyarak bu konudaki kriterleri tartışmıştır. Bochdalek, hastalığın toraks ile batını ayıran membranın posterolateral kısmındaki rüptüre bağlı geliştiğini belirtmiştir. Başarısız olsa da ilk tedavi girişimleri 1888'de Nauman ve O'Dwyer tarafından denenmiştir. İlk başarılı onarım, 1901'de Aue tarafından bir erişkinde, Heidenhain tarafından ise 1905'de bir çocukta yapılmıştır. Hedblom 1925'de, hastalığın kendi serisinde %75 oranında ölümcül seyrettiğini belirtmiştir. İlk başarılı tedavi 1946'da Gross tarafından küçük bir bebekte uygulanmıştır (20).

#### **3.2. Sıklık**

KDH yaklaşık 2000-5000 canlı doğumda bir görülür. Bebeklerin yaklaşık 1/3'ü prematür doğarlar ve ağır doğumsal anomaliler sebebiyle ölürlür. Diyaframadaki defekt %80 oranında solda, %20 oranında sağda görülür. Bilateral KDH ise oldukça nadirdir. %2 oranında KDH'lı ailesel vakalar bildirilmesine rağmen sporadik olduğu düşünülür (22).

#### **3.3. Etiyoloji**

KDH'nın nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Bazı genetik ve çevresel etkenlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Aneuploidiler, genetik sendromlar ve kromozomal yapısal anomaliler (delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon) suçlanan genetik etkenlerdir. En sık, aneuploidilerden trizomi 13, 18, 21 ve 45X0, genetik sendromlardan Fryns sendromu gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörü COUP-TF2 ve Friend of Gata2 (FOG2) genindeki mutasyonlar anormal diyafragma gelişimine ve pulmoner hipoplaziye neden olur. Hayvan deneyleriyle ispatlanmış çevresel faktörlerden biri, embriyonik gelişimde anahtar rol oynayan vitamin A türevi olan retinoik asittir. Ayrıca insektisitler, fenmetrazin, talidomide, kinin, kadmiyum, kurşun ve nitrofen etyolojide suçlanan ajanlar arasındadır (12,22).

### 3.4. Eşlik Eden Anomaliler

KDH'lı yenidoğanlarda eşlik eden anomali insidansı %10-50 arasında değişmektedir. KDH Sendromu'nun komponentlerini (pulmoner hipoplazi, patent duktus arteriozus, patent foramen ovale ve malrotasyon) çıkartırsak KDH'lı canlı doğan hastaların yaklaşık %40'ında bir ya da daha fazla eşlik eden anomali vardır. Hastaların yaklaşık %60'ında kardiyak (kardiyak hipoplazi, ventriküler septal defekt, Fallot tetralojisi, büyük damar transpozisyonu, vasküler ring, aort koarktasyonu), %23'ünde genitoüriner, %17'sinde gastrointestinal (özofagus atrezisi, omfalosel, malrotasyon, yarık damak), %18'inde solunum sistemi (trakeal stenoz), %14'ünde santral sinir sistemi (myelomeningosel, anensefali, hidrosefali ve ensefalosel gibi nöral tüp defektleri) ve %10'unda kromozomal anomalilere (trizomi 13, 18, 21 ve 45-X0) rastlanır (24,26). Canlı doğup ameliyata hazırlık döneminde kaybedilen bebeklerin yaklaşık %25-60'ında ek major anomali varlığı bildirilmiştir. Majör ek anomali sıklığı sağ taraftaki hernilerde sola nazaran üç kat daha fazladır (27,31).

### 3.5. Embriyopatogenez

KDH, gestasyonun 8. haftasında karın ve göğüs boşluğunun birbirinden ayrılıp gelişmesini sağlayan posterolateral plöroperitoneal kanalların kapanmaması sonucunda oluşur. Midgut'un karın içine geri döndüğü 9.-10. haftalarda plöroperitoneal kanallar halen kapanmadıysa, barsaklar göğüs boşluğuna fitiklaşır. Bu durumda da barsaklar normalde yapmaları gereken rotasyon ve fiksasyon işlemlerini yapamaz. Kas yapısının olmadığı, paryetal plevra ve peritondan oluşan bir membran %10-38 olguda fitik kesesini oluşturur (20,34).

KDH'nın en klasik formu, sol tarafta posterolateral bölgede defekt olarak karşımıza çıkar. Bu defektten, karaciğer sol lobu, dalak ve hemen tüm gastrointestinal sistem göğüs boşluğuna geçmiştir. Sağ taraftaki hernilerde ise, karaciğer sağ lobu ve diğer karın içi organlar göğüs boşluğuna geçer. Bu olgularda hepatik venler ektopik olarak sağ atriya açılabilir, bu da cerrahi onarımı güçleştirebilir (35).

Bazı araştırmacılar göğüs boşluğuna geçen organların o taraf akciğerine bası yaparak parankimin gelişmesine engel olduğunu, bunun da akciğer hipoplazisi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan akciğer hipoplazisinin aslında primer olay olduğu ve diyafragma defektinin ise buna sekonder olarak geliştiği de ileri sürülmektedir. Akciğer hipoplazisine, defektin olduğu tarafta daha ağır olmakla birlikte, karşı tarafta da rastlanması bu görüşü desteklemektedir. Fitiklaşma bronşiyal bölünme aşamasında olduğu için akciğer gelişimi de bu dönemde etkilenir. Akciğerin hem hacmi hem de ağırlığı azalmıştır. Ana bronş

tomurcukları olmasına rağmen bronşiyal dalların sayısı bariz olarak azalmıştır. Bu bulguya hem diyafragma defektli tarafta hem de karşı taraf akciğerinde rastlanır. Alveoler gelişim de önemli ölçüde etkilenmiştir ve doğumda çok az normal yapıda alveole rastlanır. Alveoller immatür yapıdadır ve artmış glikojen içeren kalınlaşmış alveoler septumlar bulunur. Terminal sakkuluslar ve alveoler birimlerdeki anormal septasyonlar gaz alışverişini zorlaştırır. Sürfaktan azalmıştır. Akciğer parankimi arterlerinin sayısında azalma vardır. Hem preasiner hem de asiner arteriollerde uygun olmayan aşırı mediyal kas hiperplazisi bulunur. Normalde respiratuar bronşiyollerden sonraki yapıların arteriollerinde kas tabakası yok iken KDH'da bu damarlarda da kas bulunur (35,36,37).

Bu değişiklikler hem defekt tarafı hem de karşı tarafta bulunur. Arter yapılarında bu anormal kas yapılaşmasının sonucu ise pulmoner hipertansiyon gelişimine aşırı yatkınlık oluşur. Fötal yaşam sırasında pulmoner vasküler rezistans yüksektir ve pulmoner kan akımı, kardiyak output'un sadece %7'sini oluşturur. Plasentadan gelen oksijenize kan foramen ovale ve duktus arteriozus kanalıyla sağdan sola geçerek sistemik dolaşıma katılır. Doğumla birlikte bu dolaşım şeklini tümüyle değiştirecek olaylar gelişir. Bebeğin ilk soluk alış verışı ile birlikte pulmoner arter basıncı yanı sıra pulmoner vasküler direnç düşer ve bu da pulmoner kan akımının artmasına yol açar. Sol atrium basıncı ile birlikte sistemik vasküler direncin de artması foramen ovalenin kapanmasına neden olur. Artmış arteriyel oksijen basıncı da duktus arteriozusun kapanmasını sağlar. Bu şekilde fötal tipten erişkin tipi dolaşım şekline geçilir. Bu süreç kesintiye uğrarsa "persistan fötal dolaşım" gelişir. Plasenta dolaşımı kesildiği an devam eden artmış pulmoner vasküler direnç pulmoner kan akımında azalmaya yol açar. Atrium ve duktal seviyelerde sağ-sol şant gelişir ve desatüre kan sistemik dolaşıma geçer. Hipoksi pulmoner damar direncini, dolayısıyla da sağ-sol şantı artırır. Ağır ve ilerleyici bir solunum yetmezliği ortaya çıkar (38).

KDH'da pulmoner damar direncinin yüksek olma eğiliminin nedeni olarak, etkilenen akciğerde toplam arterioller kesit yüzey alanında azalma ve arteriyel yapıların duvarındaki kas yapısında kalınlaşmanın etkili olduğu belirtilmiştir. Bu yapısal arteriyel değişikliklerin zemininde hipoksi, asidoz, hipotermi, hiperkapni ve stres gibi faktörlerin de uyarısı ile pulmoner hipertansiyon kolaylıkla gelişir. Bu süreçte rol alan mediyatörler ise prostaglandinler, lökotrienler, katekolaminler ve renin-anjiyotensin sistemidir (16,38).

### **3.6. Tanı**

#### ***Prenatal tanı***

KDH'nin tanısı genellikle %40-90 doğrulukla prenatal ultrasonografi ile yapılabilir. Diyafragma gelişimi en geç 12. haftada tamamlandığından teorik olarak diyafragma hernisi tanısı antenatal ultrason (USG) ile 12. haftada tespit edilebilir olması gerekirken insanda en erken 15. haftada tespit edilebilir. Bu haftada fetusun toraks boşluğunda kistik ve heterojen bir görüntü olacağından bu haftada görülebilen kistik adenomatöz malformasyon, sekestrasyon veya özofagus duplikasyonu ile de karıştırılabilir (40,41).

Prenatal ultrasonografi tanı kriterleri, polihidroamnios, karın içi organların kalp ile aynı kesit yüzeyinde görüntülenmesi, karın içinde sıvı dolu midenin görülememesi, karaciğer ve diğer solid organların toraksta saptanmasıdır (40,41). Sağ taraftaki hernilerde diyaframadaki açıklık karaciğer tarafından kapatılırsa toraks boşluğunda içi boş organlar görüntülenemeyebilir.

Fötal akciğer ve karaciğerin ekojeniteleri birbirine yakın olduğu için şüphelenilen durumda karaciğerin kan akımına bakmak için Doppler USG'den yararlanılabilir(41).

KDH'ni diğer torasik patolojilerden ayırt edebilmek için fötal manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanılabilir. Kromozom çalışmalarında 13, 18, 21 gibi çeşitli trizomilere ve 12p tetrazomisine rastlanmıştır.

### ***Postnatal tanı***

Doğumdan sonra bebeğin semptomlarının derecesini akciğerlerin hipoplazisi ve pulmoner hipertansiyon belirler. Çok ağır olgularda doğumdan hemen sonra bulgular gözlenirken çoğu olguda ilk 24 saat içinde belirti verir. En belirgin semptom, solunum sıkıntısı ve siyanozdur. Fizik muayenede, çökük karın ve asimmetrik, huni biçimli bir göğüs yapısı vardır. Toraks boşluğunda barsak sesleri duyulabilir. Mediastinal kayma venöz dönüşü bozar. Sonuçta hipotansiyon ve periferik perfüzyon bozukluğu gelişir.

Direkt grafide, toraksta mide ve barsaklara ait gaz gölgelerinin görülmesi tanı koydurucudur. Ayrıca nazogastrik sondanın ucunun da göğüs boşluğunda görülmesi tanıyı destekler. Mediasteninin açılanması ve kardiyak silüetin karşı tarafa yer değiştirmesi ek bulgulardır. Ek anomalileri araştırmak için renal ve kranial ultrasonografi, ekokardiyografi ve karyotipleme yapılabilir (44).

## **3.7. Prognostik Faktörler**

### ***Anatomik Faktörler***

- Prenatal tanı: KDH'nın intrauterin 24. haftadan önce tanınmasının kötü prognozu işaret ettiği öne sürülse de bazı araştırmacılar ek anomalilerin eşlik etmediği durumlarda sadece bunun bir gösterge olamayacağını belirtmektedir (42).
- Ek anomaliler: Kötü prognozu gösterir.
- Polihidroamnios: Polihidroamnios genellikle izole KDH'da az olup daha çok beraberinde ek anomaliler varsa belirgin olduğundan kötü prognoza işaret ettiği görüşü yaygın olmakla birlikte, bazı çalışmalarda prognoza hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (42).
- Midenin pozisyonu: Midenin göğüs boşluğunda olduğu hastalarda sağ kalımın %0-30'a düştüğü bildirilse de bazı çalışmalarda bu durum gösterilememiştir. Sağ taraf KDH'larında prognozun sola göre daha kötü olduğunu ileri süren görüşlerin yanında herni tarafının prognozu etkilemediğine dair yayınlar da mevcuttur (40,43).
- Karaciğer herniasyonu: Prognozun kötü olduğunu gösterir (43).
- Akciğer Baş Oranı (Lung-to-head ratio: LHR): Ultrasonografik ölçümde LHR1'in altında ise kötü prognozu gösterir.) (45).
- Fötal akciğer hacim ölçümü: Fötal MR ile akciğer hacim ölçümünde rölatif akciğer hacminin %40'ın altında olması kötü prognozu gösterir (45,46).
- Kardiyoventriküler indeks (sol ventrikül/sağ ventrikül), kardiyovasküler indeks, Modifiye McGoon indeks (hiler pulmoner arter çapları/inen aorta).Modifiye McGoon indeksinin 1,3'e eşit ya da daha küçük olması kötü prognozu gösterir.

### ***Fizyolojik parametreler***

- Kan gazı analizi: PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> ve pH bugün için prognozu belirlemek için en gerçekçi parametrelerdir. Düşük PaCO<sub>2</sub> ve normal ya da tedavi ile normale yaklaşan PaO<sub>2</sub> değeri olan hastalarda prognozun iyi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu ölçümler hem preduktal hem de postduktal kanda yapılmalı ve bu şekilde sağ-sol şantın derecesi de değerlendirilmeye çalışılmalıdır. Kan pH'nın 7,2'nin üzerinde iyi, 6,8'nin altında kötü prognozu gösterdiği bildirilmiştir.
- Alveoler-arteriyel oksijen gradiyenti (AaDO<sub>2</sub>):  

$$AaDO_2 = [(713 \times FiO_2) - PaCO_2] / 0,8 - PaO_2$$
 Bu formüle göre AaDO<sub>2</sub>, 500'ün üzerindeyse mortalite artmaktadır.
- Ventilasyon indeksi (VI):  

$$VI = \text{Solunum sayısı} \times \text{ortalama hava yolu basıncı} \times PaCO_2$$



- Modifiye ventilasyon indeksi (MVI):

$$\text{MVI} = (\text{Solunum sayısı} \times \text{maksimum inspiratuvar basınç} \times \text{PaCO}_2) \div 1000$$

MVI 40'ın altında olan hastalar yaşarken, 80'in üstünde tüm hastaların kaybedildiği bildirilmiştir.

- Oksijenizasyon indeksi (OI):

$$\text{OI} = \text{Ortalama havayolu basıncı} \times \text{FiO}_2 / \text{PaO}_2$$

### ***Pulmoner fonksiyon testleri***

- Fonksiyonel rezidüel kapasite ölçümü: Pulmoner hipoplazinin önceden değerlendirilmesine olanak sağlar.
- Total pulmoner kompliyans ölçümleri

Bugüne kadar tek parametrenin prognozu göstermekte yeterli olabileceği kanıtlanamamasına karşın, çok merkezli çalışmalarda prenatal tanı, doğum kilosu, düşük 1. ve 5. dakika APGAR skoru ve sağ taraflı hernilerin mortaliteyi tahmin etmekte herbirinin ayrı öneminin olduğu gösterilmiştir (47).

## **3.8. Tedavi**

### ***Prenatal Bakım***

KDH prenatal olarak tanındığında fetus özellikle ek kardiyovasküler ve nörolojik anomaliler açısından da incelenmelidir. Fötal karyotip, amniyosentez, koryonik villüs veya fötal kan örnekleme yapılarak araştırılmalıdır. Normal doğum zamanına mümkün olduğunca yakın doğumun yapılması sağlanmalıdır. Prenatal tanının yararı bebek için gerekli hazırlıkları zamanında yapmak ve ebeveynleri tedavi seçenekleri ve prognoz açısından bilgilendirmektir. Doğumun bebek için solunum desteğinin tam olarak yapılabileceği merkezlerde olması sağlanmalıdır.

### ***Pre-operatif Bakım***

KDH'nın cerrahi değil, fizyolojik bir acil hastalık olduğu unutulmamalı ve operasyon öncesi kalp ve solunum fonksiyonları stabil hale getirilmelidir. Düzeltilemeyen akciğer hipoplazisi ve geri dönebilen pulmoner hipertansiyon arasındaki denge, tedaviye yanıtı ve dolayısıyla da prognozu belirler. Her iki durumun da klinik sonuçları; pulmoner vasküler dirençte artma, pulmoner arter basınçlarında yükselme, sağ-sol şant ve ilerleyici hipoksidir.

Akciğer gelişimini sağlayacak bir yöntem olmadığı için tüm tedavi seçenekleri pulmoner damar tonusunu düzeltmeye yöneliktir (40,41).

Pre-operatif bakımda kardiyopulmoner destek önemlidir. Hasta entübe edilir ve nazogastrik sonda yerleştirilir. Göğüs boşluğundaki mide ve barsakları hava ile şişirip akciğere olan basıyı arttırmamak için kesinlikle balon ve maske ile ventilasyon yapılmaz. Arteriyel ve venöz kateterler yerleştirilir. Arteriyel oksijen saturasyonu hem preduktal hem de postduktal olarak ölçülür. Stres yaratabilecek her türlü uyarı pulmoner arter basınçlarını, dolayısıyla da sağ-sol şantı arttırıp hipoksiyi derinleştireceği için hasta sedatize edilmelidir (47).

Hipotansiyon ve doku perfüzyonunu düzeltmek amacıyla sıvı resüsitasyonu yapılmalıdır. Dopamin ve dobutamin gibi (+) inotropik ilaçlar verilebilir. Metabolik asit-baz dengesizlikleri genellikle hipoperfüzyon sebebiyle gelişir. Sıvı tedavisi ve bikarbonat uygulamaları ile düzeltilebilir. Ağır hiperkapni, ventilatör parametreleri değiştirilerek engellenebilir (48).

KDH'da pulmoner hipertansiyonu düzeltmek amacıyla farmakolojik ajanlar kullanılabilir. Bu ilaçlar arasında en etkilisi  $\alpha$ -reseptör blokajı yapan tolazolindir. Güçlü bir vazodilatatör olan nitrik oksit (NO), persistan pulmoner hipertansiyona bağlı solunum yetmezliğinde oksijen saturasyonunu yükseltmede etkili olduğu gösterilmiştir. Kalsiyum kanal blokörleri, prostasiklin deriveleri, endotelin reseptör antagonistleri ve sildenafil gibi fosfodiesteraz-5 inhibitörlerinin etkinliği araştırılmaktadır. Prenatal tanı hastalarda surfaktanın profilaktik kullanımının etkili olduğu düşünülmektedir (49,50).

Oksijenizasyonu arttırmak, pulmoner hipertansiyonu azaltmak ve konvansiyonel ventilasyonun neden olduğu barotravmayı en aza indirmek için belirli bir süre hastaya oksijen sağlayan kardiyopulmoner bypass uygulanabilir. Bu işleme ekstra korporalmembran oksijenizasyonu (ECMO) denir. ECMO veno-arteriyel ya da venö-venöz şant ile uygulanabilir. Şant işlemi sıklıkla internal juguler ven ile sağ karotis arter arasında uygulanır. ECMO reversibl persistan pulmoner hipertansiyon tedavisinde faydalıdır. ECMO ile tedavi edilen KDH'da sağkalım %60'tır (51).

### **Ventilasyon seçenekleri;**

#### **• Konvansiyonel mekanik ventilasyon:**

1. Hiperkapniye izin veren 'hafif' ventilasyon
2. Yüksek frekanslı pozitif basınçlı ventilasyon (HFPPV)

- **Yüksek frekanslı osilatuar ventilasyon**'dur (HFOV).

Hipokapni ve alkaloz oluşturularak duktal şanti azaltmak ve persistan fotal dolaşıma engel olabilmek amacıyla hiperventilasyon uygulanabilir. Ancak hiperventilasyonun zaten hasarlı olan akciğer parankiminde barotravma yapma riski çok yüksektir. Bu nedenle hiperkapniye izin verilmekte ve ventilatöre bağlı akciğer hasarı gelişimine engel olunabilmektedir.

### ***Cerrahi Tedavi***

Cerrahi onarımın tam olarak ne zaman yapılması gerektiği kesin değildir. Ameliyat edilmemiş hastalarda zamanla pulmoner arter basınçlarının düştüğü gösterilmiştir. Bu nedenle pulmoner arter basıncı düşene kadar beklenmesi gerektiği savunulmuştur. Son yıllarda geçerli olan görüş hastanın klinik olarak stabilizasyonu sağlandıktan sonra cerrahi onarım yapılması yönündedir. Bu stabilizasyon süresi birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişmektedir. KDH'da cerrahi tedavinin temeli, diyafragmadaki defektin primer olarak onarılmasına dayanır. Defekt çok genişse, onarımda perirenal fascia, torasik ya da abdominal kas flepleri gibi çevre dokular veya sentetik prostetik materyaller kullanılabilir. Günümüzde diyafragma hernisinin hem torakoskopik hem laparoskopik cerrahi ile onarımı mümkündür (53,53).

### ***Post-operatif Bakım***

Ameliyat sonrası dönemde preduktal PaO<sub>2</sub> seviyesi 80mmHg'nin üzerinde, PaCO<sub>2</sub> seviyesi ise 30-35mmHg'nin altında olacak şekilde ventilatör parametreleri ayarlanır. Ventilatör desteğinin kesilmesi yavaş ve uygun parametreler doğrultusunda olmalıdır. Pulmoner hipertansiyon, şant ve ventriküler performansı değerlendirmek amacıyla ekokardiyografi yapılmalıdır (55).

### **3.9. Gelecekteki Tedavi Seçenekleri**

KDH, tedavide geline daha iyi sonuçlara rağmen, karmaşık ve yeni tedavi yöntemlerine açık bir hastalıktır. KDH'ni önleme ve mortaliteyi azaltmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Fotal Cerrahi: Bu girişimler çok az sayıda merkezde insanlarda uygulanmaktadır. Asıl sorun fotal cerrahi için hasta seçiminin kolay olmamasıdır (54).

Fotal cerrahi yöntemler;

- Açık KDH onarımı

- Açık PLUG tekniği (Open plug the lung until it grows procedure)
- Açık klips tekniği (Open clip procedure )
- FETENDO klips tekniği (Fetoscopic temporary tracheal occlusion clip procedure)
- FETENDO balon tekniği (Fetoscopic temporary tracheal occlusion balloon procedure)

Akciğer transplantasyonu:Donör bulma zorluğu nedeniyle uygulanması sıkıntılıdır.

Parsiyel likit ventilasyonu:Bazı yenidoğanlarda solunum sıkıntısından kurtarmak için iyi bir seçenektir.

Farmakolojik ajanlar: Akciğer gelişimini sağlamak amacıyla tirotropin salgılayıcı hormon ve glukokortikoidlerin deneysel KDH modelinde akciğer gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir. Büyüme faktörlerinin de bu gelişmede etkili olabileceği düşünölmüş ve yapılan deneysel çalışmalarda, endotelial büyüme faktörü (EGF) kullanımının akciğer gelişimini ve tip 2 pnömosit farklılaşmasını arttırdığı ve bu yolla akciğer hipoplazisine bağlı olumsuz etkileri azalttığı gösterilmiştir (56,57).

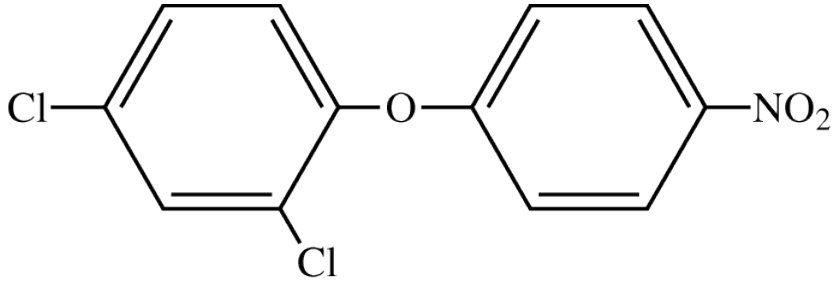
#### **4. NİTROFEN**

Nitrofen, güçlü bir pestisid ve herbisiddir. Kimyasal olarak 2,4-dichlorophenyl-4-nitrophenyl ether olarak bilinmektedir. Moleküler formülü, C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>'dür (Şekil 1)(58,59).

Nitrofen, toksik, kanserojen ve teratojen bir maddedir. Ratlarda oral yoldan verilen nitrofen, maternal toksitenin yokluğunda, indüklenen malformasyonlardan dolayı yenidoğan ölümlerine yol açmaktadır (59).

Hayvan çalışmalarda başta KDH olmak üzere çeşitli doğumsal malformasyonlara neden olmaktadır. Ratlarda nitrofenin teratojenik etkileri sonucu diyafragma hernisi en az 50 mg/kg dozunda görölmekle birlikte çalışmalarda 100 ila 200 mg/kgdozunda kullanılmıştır (58).

Şekil 1:Nitrofenin moleküler yapısı



## 5. N- ASETİL SİSTEİN (NAC)

NAC, L- sistein aminoasidinin N-asetil türevidir. İlk olarak 1960'larda mukolitik bir ajan olarak tanımlanmıştır. NAC'ın biyolojik aktivitesi sülfidril grubundan kaynaklanmaktadır. Amino grubuna bağlı asetil, oksidasyona karşı bu molekülün daha stabil olmasını sağlar. Yapısındaki sülfidril grubuna bağlı olarak, glutatyon-S- transferaz aktivitesini ve glutatyon sentezini artırarak serbest oksijen radikallerine etki eder (8,60).

NAC sadece bir glutatyon prekürsörü değildir, aynı zamanda serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneğine de sahip bir ajandır. NAC'ın farmakolojik etkileri, boşalmış olan indirgenmiş glutatyon depolarını tekrar doldurarak hücrelerin potansiyelini yenilemeyi de içerir (61,62).

NAC mukolitik bir ajandır. Etkisini balgam içerisindeki disülfür yapısındaki mukoproteinleri parçalayarak, endotel ve bronşiyal epitel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin üretimini regüle ederek gösterir. NAC'ın pulmoner fibrozis, akut akciğer yaralanması, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda klinik faydası görülmüştür (63).

## 6.D VİTAMİNİ

İnsanlarda vitamin D'nin iki şekli bulunur. Bunlar vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3'dür (kolekalsiferol). Vitamin D3 deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterol'den elde edilir. 290-315 dalga boyundaki ultraviyole güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterol önce previtamin D3'e dönüştürülür. Daha sonra izomerizasyon ile previtamin D3'den vitamin D3 oluşur. Vitamin D3 dışarıdan diyetle özellikle yağlı balıklarla da alınır. Özellikle ringa balığı ve uskumru vitamin D3 açısından zengindir. Vitamin D2 ise bitkilerin güneş ışınları ile karşılaşması sonucu oluşur. Güneş ışınları ile oluşan vitamin D3, D vitamini gereksiniminin % 90-95'ini karşılar. Deriden sentez edilen ve besinlerle alınan D3 ve D2 vitaminleri

karaciğerde 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) ve 25-hidroksi vitamin D<sub>2</sub>'ye (25(OH)D<sub>2</sub>) dönüştürülür. 25(OH)D (kalsitriol) hem 25(OH)D<sub>3</sub> hem de 25(OH)D<sub>2</sub>'yi tanımlamak için kullanılır. Karaciğerde sentez edilen 25(OH)D vitamini, D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak böbrek dokusuna taşınır. DBP-25(OH)D vitamin kompleksi renal tübül hücrelerine girer ve burada serbest kalan 25(OH)D vitamini mitokondride sitokrom P450 enzim sistemi birlikteliğinde 1- $\alpha$ -hidroksilaz enzimi ile aktif D vitamini olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D'ye dönüştürülür. Eğer 1,25(OH)<sub>2</sub>D yeterli ise 25(OH)D'nin bir kısmı 24-25(OH)D'ye dönüştürülür. Bu daha az aktiftir ve katabolize edilir. D vitamini bağlayan protein 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D ve 24-25(OH)D metabolitlerine yüksek afinite ile bağlanır ve aminoasit yapısı olarak albümine benzer.

D Vitamini, kalsiyum hemostazındaki rolü uzun zamandır bilinen önemli bir steroid hormondur. Kemik metabolizması yanında vücuttaki birçok dokuda hücre farklılaşması ve proliferasyonunda önemli rolü vardır. Vücutta çoğu doku ve hücreleri D vitamini aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D bulundurur. 1,25-dihidroksi D vitamini solunum fonksiyonları üzerine etkilidir. Matriks metalloproteinazlarını, fibroblast üremesini engelleyerek kollajen sentezini etkiler ve akciğer dokusunun yeniden modellenmesini sağlar (64).

## 7. TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 esas olarak negatif bir büyüme faktörüdür. Multifonksiyonel düzenleyici peptidler ailesinden olup, inflamasyonda, yara iyileşmesinde, karsinogenezde işlevleri vardır. 122 aminoasitten oluşan identik 2 peptid zincirinin oluşturduğu 25 kDa ağırlığındaki homodimerik peptid ana yapısını oluşturur. TGF- $\beta$  ailesinin 3 sub grubu bulunur. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 1 309 aminoasit içerir. TGF- $\beta$ 1'in bağışıklık sistemi ve hücre remodilasyonunda önemli bir rolü vardır. TGF- $\beta$ 1 apoptozisi sağlar ve gelişmekte olan bir hücrede hücre farklılaşmasına yol açar. Genelde salındığında biyolojik olarak aktif değildir. Latent haldeki TGF- $\beta$ 1 bağlayıcı proteinle birleşerek büyük latent bir kompleks oluşturur. Daha sonra çeşitli sinyal ileti yolları ile aktif hale gelir (65, 66). Büyüme faktörleri hücreler arası boşluğa salınıp, köken aldıkları hücre tipine göre otokrin fonksiyon görebildikleri gibi, benzer veya farklı tipteki komşu hücrelere parakrin etkide bulunabilirler (10, 67, 68, 69). Mikroçevredeki fizyolojik kokteyilde yer alan pozitif ve negatif büyüme faktörlerinin dengesi ve epitel hücrelerine gönderdikleri sinyaller ortaya çıkacak etkileri belirler. TGF- $\beta$ 'nin bifazik bir etki profili vardır.

- Organizmadaki sağlıklı dokularda otokrin negativite hipotezinden yola çıkılarak inhibitör büyüme faktörü yolunu takip eden tümör baskılayıcı rolü izlenir.
- Karsinogenezin erken dönemindeki tümör baskılayıcı rol, tümör geliştikçe potansiyel protoonkogen role dönüşür. Hastalığın ilerlemesiyle anjiogenez, stroma formasyonu ve immünsüpresyon ile birlikte tümör büyümesine yol açarlar.

## 8. SÜRFAKTAN PROTEİN A

Sürfaktan, tip II hücreler tarafından sentezlenen, fiziksel olarak deterjan özelliğinde olan bir lipoproteindir (70,71).

Sürfaktan sentezi 20. haftada başlar, 24. haftadan sonra hızla artar. Sürfaktanın yapısı %90 lipidlerden, %10 proteinden oluşur. Lipidlerin %70-80'ini fosfolipidler,%10'unu ise çoğu kolesterol olan nötral lipidler oluşturmaktadır. Fosfolipidlerin %80'i fosfatidilkolin(PTC), %8-12'si ise fosfatidilgliserol (PTG),fosfatidilinositol (PTI) ve fosfatidiletanolamin (PTE)'dir (70, 72).

Fosfatidilkolinin %50-55'i iki yağ asidi zinciri ile satüre olarak sürfaktanın en aktif yüzey komponenti olan dipalmitoilfosfatidilkolini (DPPC) oluşturur. Bilinen sürfaktan proteinleri dört çeşittir. Bunlar; SP-A, SP-B, SP-C ve SP-D.SP-A, tip II hücrelerde sentezlenip lameller cisimciklerdeki fosfolipidler ile birlikte sekrete edilir (69,70).

Sürfaktanların bilinen fonksiyonları;

- alveol duvarını uygun bir nemlilikte tutmak
- pasif ekspirasyon esnasında daha kolay elastik büzülme için sabit esansiyel bir faktör olarak rol oynamak
- hava-sıvı tabakasında yüzey gerilimini azaltarak alveollerin stabilizasyonunu sağlamak ya da ekspirasyon esnasında küçük alveollerin kollapsını ve daha büyük alveollere yapışmasını önlemek
- kapiller ve interstisyel sıvıların alveoller içerisine infiltrasyonuna karşı direnç oluşturmak

- inhalasyon sonucu alveollere kadar ulaşabilecek küçük partiküllerin emülsifiye edilmesini sağlayarak bunların makrofajlar tarafından fagositozunu kolaylaştırmaktır.

Sürfaktan yetersizliği ya da kompozisyonundaki farklılıkların prenatal ve neonatal dönemde yetersiz akciğer gelişimi ve yetişkinlerin birçok pulmoner hastalığı ile ilgili olduğu bildirilmektedir.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **HAYVANLARIN HAZIRLANMASI**

Çalışma öncesi ratlar standart besinler ile beslendi ve çiftleşmeye bırakıldı. Günlük vaginal sürüntüler alınarak gebelik tayin edildi. Vaginal sürüntüde spermin görüldüğü gün gebeliğin sıfırıncı günü olarak kabul edildi. Gebe ratlar rastgele seçilerek gruplara ayrıldı. Her gruba 4 gebe rat seçildi.

Grup 1 (Sham Grubu) : Gebe ratlara gestasyonun 9,5. gününde 1ml zeytinyağı orogastrik yol ile verildi. 36 tane yavru rat doğdu ve bunlardan rastgele 10 tanesi seçildi. Seçilen yavru ratlardan 2 tanesinin akciğerleri alım esnasında zedelenince 8 yavru rat öldürülerek akciğer doku örnekleri alındı.

Grup 2 (Nitrofen Grubu): Gebe ratlara hamileliğin 9,5. gününde 1ml zeytinyağı içinde 200 mg nitrofen orogastrik yol ile verildi. 34 yavru rat doğdu ve KDH gelişen 14 yavru rattan akciğer doku örnekleri alındı.

Grup 3 (Nitrofen+NAC Grubu): Gebe ratlara hamileliğin 9,5. günde 1ml zeytinyağı içinde 200 mg nitrofen orogastrik yol ile verildikten sonra 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 800mg/kg'dan NAC verildi. 56 yavru rat doğdu ve KDH gelişen 37 yavru rattan akciğer doku örnekleri alındı.

Grup 4 (Nitrofen+D Vitamini Grubu): Gebe ratlara hamileliğin 9,5. gününde 1ml zeytinyağı içinde 200 mg nitrofen orogastrik yol ile verildikten sonra 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 1 mcg/kg'dan D vitamini verildi. 31 yavru rat doğdu ve KDH gelişen 17 yavru rattan akciğer doku örnekleri alındı.

Grup 5 (Nitrofen+NAC+D Vitamini Grubu): Gebe ratlara hamileliğinin 9,5. gününde 1 ml zeytinyağı içinde 200 mg nitrofen orogastrik yol ile verildikten sonra 16. günden itibaren 4 gün süre ile subkutan yol ile 800mg/kg'dan NAC ve 1 mcg/kg'dan D vitamini verildi. 33 yavru rat doğdu ve KDH gelişen 16 yavru rattan akciğer doku örnekleri alındı.

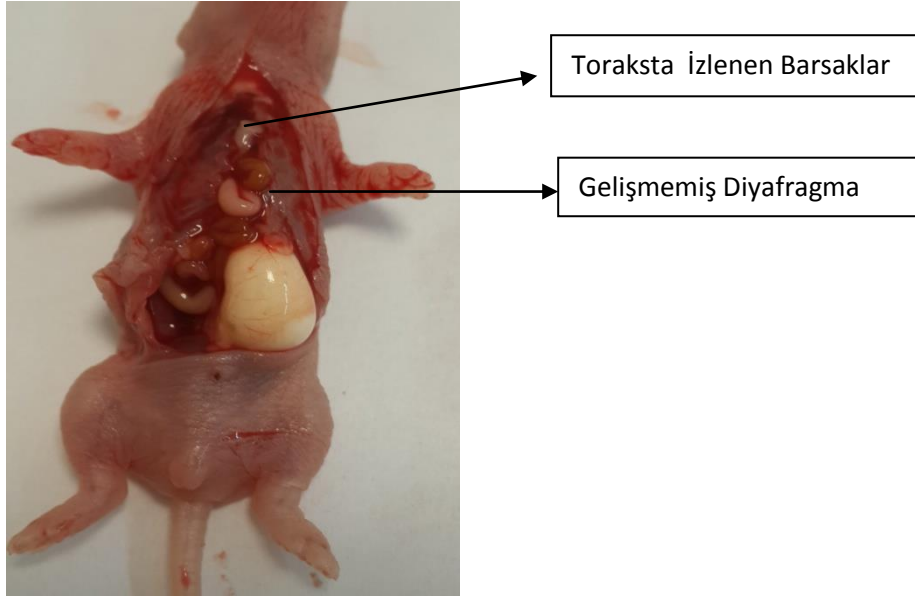


## ÖRNEKLERİN ALINMASI

Gebe ratlar yakından takip edildi. Gebeliğin 21-22.gününde doğan yavru ratların ölü ya da canlı olup olmadığı kaydedildi. Ardından ratlar 90mg/kg'dan ketamin + 10mg/kg xylazine intramuskuler uygulanarak anesteziye edildikten sonra dekapitasyon yöntemi ile öldürüldü. Grup 3, grup 4 ve grup 5'ten tüm yavru ratlara Grup 1 ve Grup 2 'den ise belirlenen sayıda, rastgele seçilen yavru ratlara laparotomi yapıldı.

Barsakların batın içinde olup olmadığı kontrol edildi. Diyafragmalarında defekt olup olmadığı araştırıldı. Ardından diyafragma hernisi tespit edilen ratlara sternotomi yapılarak torakal boşluk açıldı. Diyafragma hernisinin olduğu taraf not edildi. Akciğerler diseke edilerek çıkarıldı.(Bkz.Şekil 2) Akciğerler + 4 derecede formaldehitte 48 saat fiske edildi. Sonra loblardan 2-3 mm'lik kesitler alınıp parafine gömüldü. Parafine gömülen embriyolar transvers olarak 5µ olacak şekilde mikrotomla kesildi. Hazırlanan kesitlerin bir bölümü, hematoksilin eozin (HE) ile diğer bir kısmı da TGF-β1 ve SP-A antikoruna boyandı.

Şekil 2: Diyafragma hernisi gelişen rat yavrusu



## HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Alınan dokular tespit için %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Tespit edilen dokular 72 saat sonunda rutin ışık mikroskopi altında takibe alındılar. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere, hematoksilin eozin boyama ve TGF-β1 ve SP-A ifadelerini belirlemek amacıyla

immunohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Kesitler daha sonra Olympus BX51 marka ışık mikroskobu (Olympus, Japonya) ve Olympus DP72 dijital kamera (Olympus, Japonya) ile resimlendi.

### **Reaktiflerin Hazırlanması**

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama: %37'lik formaldehitden 10 ml, distile sudan 90 ml alınarak %10' luk fiksatif solüsyonu hazırlanmıştır.

Doku takip yöntemi

- a. Alınan dokular formaldehitde 72 saat bekletildi.
- b. Musluk suyunda 30 dakika yıkandı.
- c. %70' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- d. %80' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e. %90' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f. %100' lük etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g. Ksilende 2 saat bekletildi. Bir saat sonra ksilen yenilendi.
- h. Parafinde 2 saat bekletildi. Bir saat sonra parafin yenilendi.
- i. Dokulara parafine gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

### **İmmunohistokimyasal boyama**

Doku takip yöntemi tamamlanan akciğer bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ' luk kesitler alınarak, benmaride bekletildi. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir (Reaktifler için İnvitrogen, MD 21704, USA, Lot: 948867A Histostain-Plus kit kullanılmıştır).

- a. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 saat bekletildi.
- c. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d. Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde ikişer dakika bekletildi.
- e. Alkolden çıkan preparatlar musluk suyunda yıkanarak 10 dakika Phosphate-buffered saline (PBS)'de bırakıldı. Bu aşamada kesitler PAP pen kullanılarak işaretlendi.
- f. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, %30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1: 9) karışımı ile 30 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.

- g. PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- h. Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildedir. TGF beta (dilüe ve firma adıLot: A10210 1sürfaktan(dilüe ve firma adıLot: a12011) Bütün primer antikorlar PBS ile dilüe edildi.
- i. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edildi.
- j. Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edildi.
- k. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3- 10 dakika kadar muamele edildi.
- l. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris's hematoksilin) ile zıt boyama yapılmıştır.
- m. Kesitler musluk suyunda yıkanıp sırasıyla %50, %70, %96, %100' lük etil alkol serilerinde ikişer dakika bekletildi.
- n. Dokuların üzeri entellan ile kapatıldı.

**H&E boyama:** Alveolar septal kalınlık, interstisyum, epitelyal hücreler incelenerek değerlendirildi. Alveolar septa kalınlığı; azalmış kalınlık, normal kalınlık ve artmış kalınlık olarak derecelendirildi. İnterstisyum miktarı; azalmış, normal ve artmış olarak derecelendirildi. Epitelyal hücrelerin değerlendirilmesinde; matür epitelyal hücre (küboideal hücre) ve immatür epitelyal hücre (kolumnar hücre) ayrımı yapıldı.

**TGF-β1:**TGF-β1 antikoruna ile boyanma; artmış boyanma(grade 2), azalmış boyanma (grade 1) ve boyanma yok (grade 0) olarak derecelendirildi.

**Surfaktan Protein A:** SP-A antikoruna ile boyanma; artmış boyanma(grade 2), azalmış boyanma (grade 1) ve boyanma yok (grade 0)olarakölçeklendirildi.

## **İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME**

Bulguların istatistiksel değerlendirmesi, bilgisayarda SPSS 16 programıyla yapıldı. Nicelveriler(sağ ve sol akciğer ağırlıkları, vücut ağırlıkları, akciğer/vücut ağırlığı oranları)

Mann Whitney U Testi ile ve nitel veriler(epitel tipleri, interstisyum miktarı, septal kalınlık ve TGF- $\beta$ 1 ve SP-A ile boyanma oranları) ki-kare testi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Sham grubundaki (grup 1) dört gebe rattan, 36 yavru doğdu. Yavru ratların hepsi canlı idi. Rastgele seçilen ve laparotomi yapılan 10 yavru rattan hiçbirinde diyafragma hernisi tespit edilmedi. Ancak 2 tanesinin akciğeri alım esnasında zedelendi ve çalışma dışı bırakıldı.

Nitrofen grubundaki (grup 2) dört gebe rattan 34 yavru doğdu. Rastgele seçilen ve laparotomi yapılan 14 yavru rattan 6 (%43) tanesinde diyafragma hernisi tespit edilmedi. 8 (%57) tanesinde diyafragma hernisi tespit edildi. Diyafragma hernisi ratların 1'inde (%12,5) sağ, 1'inde bilateral (%12,5) ve 6'sında (%75) sol tarafta idi.

Nitrofen + NAC grubundaki (grup 3) dört gebe rattan 56 yavru doğdu. Hepsine laparotomi yapıldı. Laparotomi yapılan yavru ratlardan 19 (%34) tanesinde diafragma hernisi saptanmadı. 37 (%66) tanesinde diafragma hernisi tespit edildi. Diyafragma hernisi ratların 5'inde (%14) sağ, 3'ünde bilateral (%8) ve 29'unda (% 78) sol tarafta idi.

Nitrofen + D vitamini grubundaki (grup 4) dört gebe rattan 31 yavru doğdu. Hepsine laparotomi yapıldı. Laparotomi yapılan yavru ratlardan 14 (%45) tanesinde diyafragma hernisi tespit edilmedi. 17 (%55) tanesinde diyafragma hernisi tespit edildi. Diyafragma hernisi ratların 4'ünde (%24) sağ, 2'sinde bilateral (%12) ve 11'inde (%64) sol tarafta idi.

Nitrofen + NAC+ D vitamini grubundaki (grup 5) dört gebe rattan 33 yavru doğdu. Hepsine laparotomi yapıldı. Laparotomi yapılan yavru ratlardan 17 (%52) tanesinde diyafragma hernisi tespit edilmedi. 16 (%48) tanesinde diyafragma hernisi tespit edildi. Diyafragma hernisi ratların 2'sinde (%12,5) sağ, 3'sinde bilateral (%18,75) ve 11'inde (%68,75) sol tarafta idi.

Diyafragma hernisi görülme oranı grup 1 ve diğer gruplar arasında istatikselsel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) iken grup 1 haricindeki gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi ( $p > 0,05$ ). Diyafragma hernisi tespit edilen gruplarda diyafragma hernisi tarafı açısından farklılık yok idi.

## MORFOLOJİK İNCELEME SONUÇLARI

Morfolojik olarak vücut ağırlıkları, sağ ve sol akciğer ağırlıkları ve sol akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı değerlendirildi. Grup 1’de ortalama vücut ağırlığı 5gr, sağ akciğer ağırlığı 0,156 gr, sol akciğer ağırlığı 0,151 gr. ve akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı 0,03 idi. Grup 2’de ortalama vücut ağırlığı 5,2 gr, sağ akciğer ağırlığı 0,175 gr, sol akciğer ağırlığı 0,125 gr ve akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı 0,01 idi. Grup 3’de ortalama vücut ağırlığı 4,889 gr, sağ akciğer ağırlığı 0,184 gr, sol akciğer ağırlığı 0,168 gr ve akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı 0,035 idi. Grup 4’de ortalama vücut ağırlığı 4,958gr, sağ akciğer ağırlığı 0,191 gr, sol akciğer ağırlığı 0,183 gr ve akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı 0,036 gr idi. Grup 5’de ortalama vücut ağırlığı 4,968 gr, sağ akciğer ağırlığı 0,192 gr, sol akciğer ağırlığı 0,186 gr. ve akciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı 0,037 idi. İstatistiksel olarak sağ akciğer ağırlıkları ve vücut ağırlıkları ortalamaları arasında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ). Grup 2 (nitrofen grubu)’nın sol akciğer ağırlığı ortalaması ve sol akciğerin vücut ağırlığına oranı diğer gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0,05$ ) (Bkz. Tablo 1)

Tablo 1: Grupların morfolojik ölçüm değerleri

	GRUPLAR				
	Grup 1 X±SD	Grup 2 X±SD	Grup 3 X±SD	Grup 4 X±SD	Grup 5 X±SD
Sağ Akc. Ağırlığı	0.156±0.1	0.175±0.09	0.184	0.191±0.1	0.192±0.11
Sol Akc. Ağırlığı	0.151±0.08	0.125*±0.1	0.168±0.09	0.183±0.1	0.186±0.12
Vücut ağırlığı	5±1	5.2±0.9	4.889±1.2	4.958±1	4.968±1.1
Akc./VAoranı	0.03±0.001	0.01±0.002**	0.035±0.001	0.036±0.002	0.037±0.001

\*Grup 2 ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık mevcut ( $p<0.05$ )

\*\*Grup 2 ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık mevcut ( $p<0.05$ )

## HİSTOPATOLOJİK İNCELEME SONUÇLARI

Sham grubundaki (grup 1) deneklerin (n=8) hepsinde her iki akciğer septal kalınlıkları normal, epitel hücreleri matür ve interstisyum sadece bir deneğin sol akciğerinde azalmış, diğerlerinde normal bulundu.

Nitrofen grubu (grup 2) deneklerin (n=6) 2 (%33,3) tanesinde sağ akciğerlerde epitel matür karakter gösteriyordu. Matür akciğer izlenen deneklerin ikisinde de septal kalınlık normal iken interstisyum birinde normal, diğerinde artmıştı. Sağ akciğerlerinde 4 (%66,7) denekte immatür epitelyum, azalmış interstisyum ve artmış septal kalınlık mevcuttu. Tüm deneklerin sol taraftaki akciğerlerinde izlenen epitel tipi immatür karakterde olup septal kalınlıklar artmış, interstisyum ise azalmıştı.

NAC grubunda (grup 3) deneklerin (n=29) sağ akciğerlerinde 21 denekte (%72,4) matürepitel izlenmiş olup septal kalınlıkları ve interstisyum normaldir. 8 denekte (%27,6) immatürepitel görülmüştür. İmmatür epitel görülen 8 denekten 1'inde septal kalınlık ve interstisyum normal diğerlerinde septal kalınlık artmış, interstisyum azalmıştır. Deneklerin %75,9 (n=22)'unun sol akciğerinde matür, %24,1 (n=7)'inde immatür epitel izlendi. Matür epitelyum izlenen tüm deneklerde septal kalınlık normal, interstisyum birinde azalmış diğerlerinde normaldir. İmmatür epitelyum izlenen deneklerin 1'inde septal kalınlık azalmış, 2'inde normal ve 4'ünde artmıştı. İnterstisyum hepsinde azalmıştı.

D vitamini grubundaki (grup 4) 9 denekte sağ taraftaki akciğerlerde (%81,8) matür ve 2 denekte (%27,2) immatür epitel izlendi. Matür epitelyum izlenen deneklerde septal kalınlık ve interstisyum normal iken immatür epitel izlenen deneklerde septal kalınlık artarken interstisyum azalmıştı. Sol akciğerlerinde 8 (%27,8) denekte immatür epitelyum izlenirken bunların yarısında septal kalınlık artmış, yarısında normaldi. İnterstisyum 6'sında azalırken ikisinde normaldi. Matür epitelyum (n=3)(%27,3) izlenen deneklerde septal kalınlık ve interstisyum normaldi.

NAC+D vitamini grubundaki (grup 5) sağ taraftaki akciğerlerinde 8 denekte (%72,7) matür epitelyum izlenmiş olup bunların hepsinde interstisyum normal, septal kalınlık birinde artmış olup diğerlerinde normaldir. 3 denekte (%27,3) immatür epitelyum izlenmiş olup hepsinde septal kalınlık artmış ve interstisyum azalmıştır. Sol taraftaki akciğerlerinde 5'inde (%45,5) matür epitelyum izlenmiş olup matür epitelyum izlenen tüm deneklerde interstisyum ve septal kalınlık normaldir. İmmatür epitelyum izlenen 6 (%54,5) denekten 2'sinde normal septal kalınlık ve interstisyum izlenirken 4 denekte artmış septal kalınlık ve azalmış interstisyum izlendi.

İstatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arasında epitel tipi, septal kalınlık ve interstisyum miktarı açısından anlamlı farklılık mevcuttu ( $p<0,05$ ). Grup 2’de epitel tipi diğer gruplara nazaran daha immatür idi. Septal kalınlık grup 2’de diğer gruplara oranla anlamlı olarak artmıştı ( $p<0,05$ ). İnterstisyum miktarı grup 2’de diğer gruplara göre anlamlı azalmıştı ( $p<0,05$ ) (Tablo 2, 3 ve 4). Tedavi gruplarında (grup 3,4 ve 5) ise histopatolojik sonuçlarda anlamlı farklılık gözlenmedi.(Bkz. Tablo 2, 3, 4) (Bkz. Şekil 3).

Tablo 2:Sol akciğerlerde epitel tipleri

Epitel tipi	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Matür	8 (%100)*	0 (%0)	22 (%75,9)	8 (%72,7)	5 (%45,5)
İmmatür	0 (%0)	6 (%100)**	7 (%24,1 )	3 (%27,3)	6 (%54,5)
Toplam	8 (%100 )	6 (%100)	29 (%100)	11 (%100)	11 (%100)

\*Grup 1’de akciğer maturasyonu diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak matür lehine ( $p<0,05$ )

\*\*Grup 2’de akciğer maturasyonu diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak immatür lehine ( $p<0,05$ )

Tablo 3: Sol akciğerlerde alveolar septal kalınlıklar

Alveolar Septal Kalınlık	GRUPLAR				
	Grup1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Normal	8 ( %100)	0 (%0)	24 (%82,8)	7 (%63,6)	7 (%63,6)
Artmış	0 (%0)	6 (%100)*	4 (%13,8 )	4 (%36,4)	4 (%36,4)
Azalmış	0 (%0)	0 (%0)	1 (%3,4 )	0 (%)	0 (%)
Toplam	8 (%100)	6 (%100)	29 (%100)	11 (%100)	11 (%100)

\*Grup 2 ‘de diğer gruplara oranla artmış alveolar kalınlık izlendi( $p<0,05$ ).

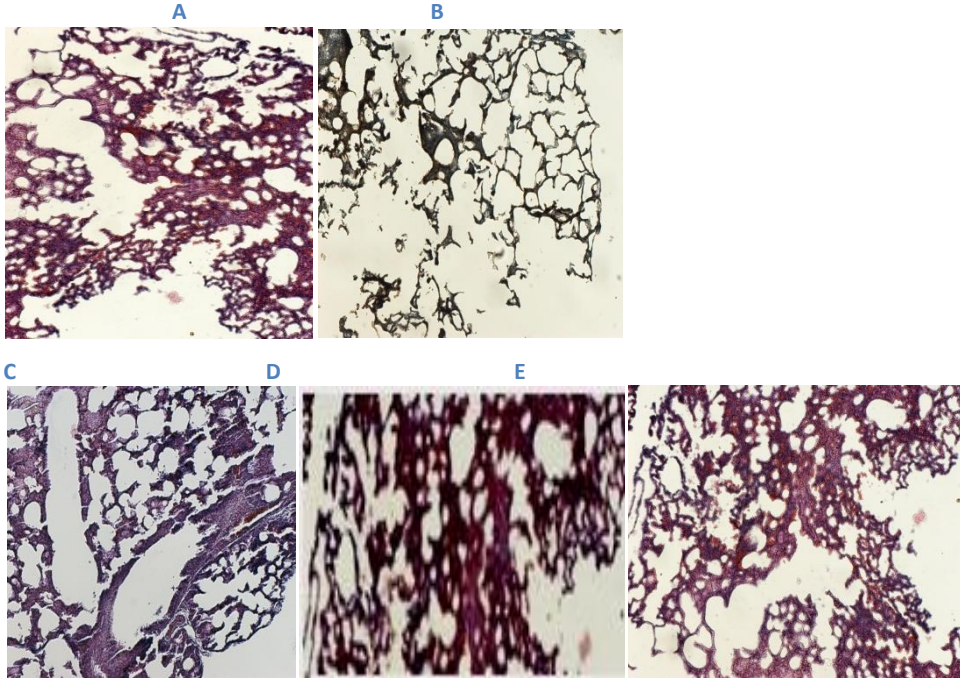
Tablo 4: Sol akciğerlerde interstisyum miktarları

İnterstisyum	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Normal	7 (%87,5)	0 (%0)	21 (%72,4)	5 (45,5)**	7 (%63,6)
Artmış	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Azalmış	1 (%12,5)	6 (%100)*	8 (%27,6)	6 (%54,5)	4 (%36,4)
Toplam	8 (%100)	6 (%100)	29 (%100)	11 (%100)	11 (%100)

\*Grup 2’de interstisyum miktarı diğer gruplara oranla anlamlı olarak azalmış ( $p<0,05$ )

\*\*Grup 4’de interstisyum oranı Grup 2’ye oranla yüksek iken grup 1, 3, 5 ‘e oranla azalmış ( $p<0,05$ )

Şekil 3:Hematoksilen-eozin ile boyalı akciğer dokusugörüntüleri: A)Sham grubu; B)Nitrofen Grubu; C)NAC Grubu; D)D Vitamini Grubu; E)NAC+D Vitamini Grubu



A-Grup 1’de matür epitel, normal septal kalınlık ve interstisyum(H&Ex200)

B-Grup 2’de immatür epitel, interstisyum azalmış (H&Ex200)

C-Grup 3’de matür epitel, artmış interstisyum (H&Ex200)

D-Grup 4’de artmış interstisyum, azalmış septal kalınlık (H&Ex200)

E-Grup 5’de matür epitel, artmış interstisyum (H&Ex200)



## İmmunohistokimya

### TGF-β1 değerleri

Sham grubundaki (grup 1) deneklerin hepsinde (n=8) boyanma sağ ve sol akciğerde grade 0 idi.

Nitrofen grubundaki ( grup 2) deneklerin (n=6) 5' inde sol akciğerinde grade 2 boyanma (%83,3) ve 1'inde grade 1 (%16,7) boyanma mevcuttu. Sağ taraftaki akciğerlerinde 4 denekte grade 2 (%66,7) ve 2 denekte grade 1 (%33,3) boyanma mevcuttu.

NAC grubundaki ( grup 3) deneklerin (n=29) sağ taraftaki akciğerlerinde 5 denekte grade 2 boyanma (%17,3), 6 denekte grade 1 (%20,7) ve 18 (%62) denekte grade 0 boyanma mevcut. Sol taraftaki akciğerlerinde 7 denekte (%24,2) grade 2, 6 denekte (%20,6) grade 1 ve 16 denekte (%55,2) grade 0 boyanma mevcuttu.

D-vitamini grubundaki (grup 4) deneklerin (n=11) sağ taraftaki akciğerlerinde 2 denekte (%18,2) grade 2, 3 denekte (%27,3) grade 1 ve 6 denekte (%54,5) grade 0 boyanma mevcut.Sol taraftaki akciğerlerinde 5 denekte (%45,5) grade 2, 1 denekte (%9) grade 1 ve 5 denekte (% 45,5) grade 0 boyanma mevcuttu.

NAC+D vitamini grubundaki (grup 5) deneklerin (n=11) sağ taraftaki akciğerlerinde 2 denekte (%18,2) grade 2, 1 denekte (%9) grade 1 ve 8 denekte (%77,8) grade 0 boyanma mevcuttu. Sol taraftaki akciğerlerinde 3 denekte (%27,3) grade 2, 1 denekte (% 9) grade 1 ve 7 denekte (% 63,7 ) grade 0 boyanma mevcuttu.

TGF-β1 ile boyanmış sağ akciğerde boyanma yoğunluğu değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark anlamlı idi ( p<0,05). Grup 2 'de diğer gruplara oranla belirgin boyanma izlendi (p<0,05).

TGF-β1 ile boyanmış sol akciğerlerde boyanma yoğunluğu değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark anlamlı idi(p<0,05).Grup 2'de diğer gruplara oranla artmış boyanma izlendi (p<005). Grup 4'te grup 3 ve 5'e oranla artmış boyanma izlendi (p<0,05)(Bkz. Tablo 5) (Bkz. Şekil 4)

Tablo 5: Sol akciğerlerde TGF-β1 ile boyanma düzeyleri

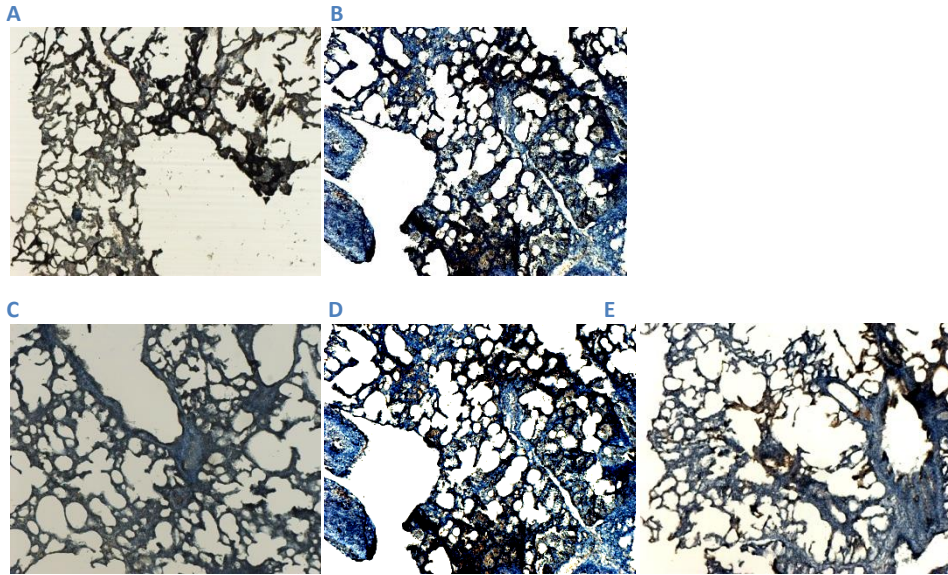
TGF-β1	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Grade 0	8(%100)*	0 (% 0)	16 (%55,2)	5 (%45,5)**	7 (%63,7)
Grade 1	0 (%0)	1 (%16,7)	6 (%20,6)	1 (%9)	1 (%9)
Grade 2	0 (%0)	5 (%83,3)*	7 (%24,2)	5 (%45,5)	3 (%27,3)
Toplam	8 (%100)	6 (%100)	29 (%100)	11 (%100)	11 (%100)

\*Grup 1’de boyanma hiç izlenmemiş.

\*\*Grup 2’de diğer gruplara oranla boyanma anlamlı olarak artmış.

\*\*\*Grup 4’te boyanma grup 3 ve 5 ile karşılaştırılınca istatistiksel olarak anlamlı artmış boyanma oranı gösteriyor.

Şekil 4:TGF-β1 ile boyanma: A)Sham grubu; B)Nitrofen Grubu; C)NAC Grubu; D)D Vitamini Grubu; E)NAC+D Vitamini Grubu



A-Grup 1’de grade 0 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
B-Grup 2’de grade 2 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
C-Grup 3’de grade 1 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
D-Grup 4’de grade 2 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
E-Grup 5’te grade 1 boyanma (İmmünohistokimya X 200)

## Surfaktan Protein A

Sham grubundaki (grup 1) deneklerin hepsinde (n=8) boyanma sağ ve sol akciğerde grade 2 boyanma mevcuttu.

Nitrofen grubundaki (grup 2) deneklerin (n=6) 4'ünde sağ taraftaki akciğerlerinde grade 0 boyanma (%66,7) ve 2'sinde grade 1 (%33,3) boyanma mevcuttu. Sol taraftaki akciğerlerinde 5 denekte grade 0 (%83,3) ve 1 denekte grade 1 (%16,7) boyanma mevcuttu.

NAC grubundaki (grup 3) deneklerin (n=29) sağ taraftaki akciğerlerinde 8 denekte grade 0 boyanma (%27,6), 8 denekte (%27,6) grade 1 ve 13 denekte grade 2 (%4,8) boyanma mevcuttu. Sol taraftaki akciğerlerinde 15 denekte (%51,7) grade 0, 8 denekte (%27,6) grade 1 ve 6 denekte (%20,7) grade 2 boyanma mevcuttu.

D-vitamini grubundaki (grup 4) deneklerin (n=11) sağ taraftaki akciğerlerinde 2 denekte (%18,2) grade 0, 3 denekte (%27,3) grade 1 ve 6 denekte (%54,5) grade 2 boyanma mevcuttu. Sol taraftaki akciğerlerinde 4 denekte (%36,4) grade 0, 3 denekte (%27,3) grade 1 ve 4 denekte (%36,4) grade 3 boyanma mevcuttu.

NAC+D vitamini grubundaki (grup 5) deneklerin (n=11) sağ taraftaki akciğerlerinde 2 denekte (%18,2) grade 0, 2 denekte (%18,3) grade 1 ve 7 denekte (%63,6) grade 2 boyanma mevcut. Sol taraftaki akciğerlerinde 2 denekte (%18,2) grade 0, 3 denekte (%27,3) grade 1 ve 6 denekte (%63,6) grade 3 boyanma mevcuttu.

Surfaktan ile boyanmış sol akciğerlerde boyanma yoğunluğudeğerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark anlamlı idi ( $p<0,05$ ). Her iki akciğerde de grup 2'de surfaktan ile boyanma belirgin azalmıştı ( $p<0,05$ ). Grup 3 ve 4'de grup 1 ve 5'e oranla surfaktan ile boyanma istatistiksel olarak anlamlı az bulundu ( $p<0,05$ ) (Bkz.Tablo 6) (Bkz.Şekil 5)

Tablo 6: Sol akciğerlerde SP-A ile boyanma düzeyleri

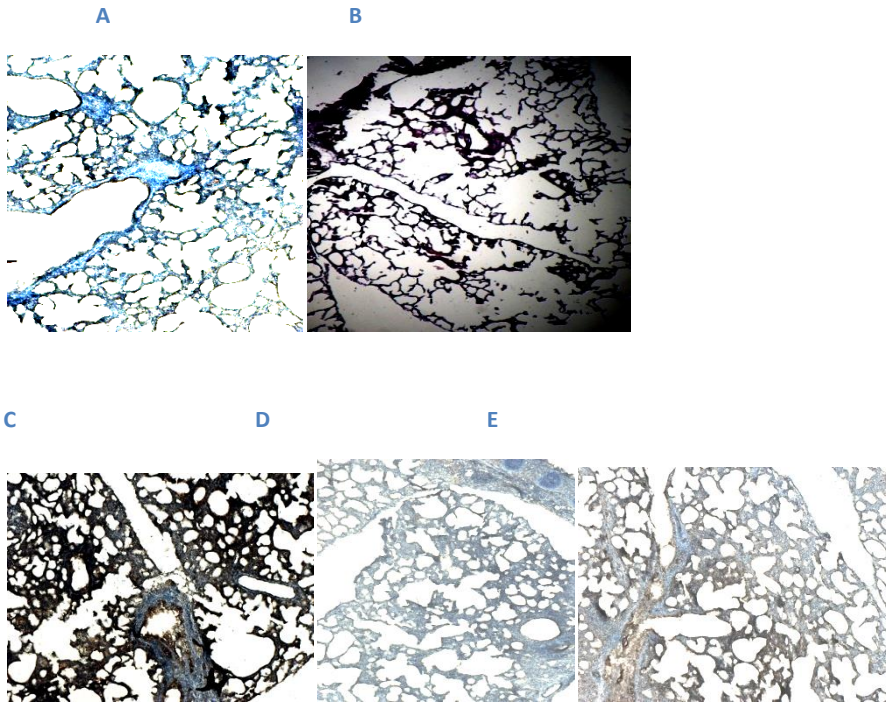
SP-A	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Grade 0	0 (% 0)	5 (%83,3)	15 (%51,7)	4 (%36,4)	2 (%18,2)
Grade 1	0 (%0)	1(%16,7)	8 (%27,6)	3 (%27,3)	3 (%27,3)

Grade 2	8 (%100)**	0 (%)*	6 (%20,7)	4 (%36,4)	6 (%63,6)**
Toplam	8 (%100)	6 (%100)	29 (%100)	11 (%100)	11 (%100)

\*Grup 2’de diğer gruplara oranla anlamlı azalmış boyanma

\*\*Grup 1 ve 5’te grup 3 ve 4’e oranla artmış boyanma

şekil 5:Süşfaktan ile boyanma: A)Sham grubu; B)Nitrofen Grubu; C)NAC Grubu; D)D Vitamini Grubu; E)NAC+D Vitamini Grubu



A-Grup 1’de grade 2 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
B-Grup 2’de grade 0 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
C-Grup 3’de grade 1 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
D-Grup 4’de grade 2 boyanma (İmmünohistokimya X 200)  
E-Grup 5’de grade 1 boyanma(İmmünohistokimya X 200)

## 5. TARTISMA

Konjenital diyafragma hernisi (KDH), akciğer gelişiminin erken dönemlerinde karın içi organların fetal göğüs boşluğuna girmesine neden olan, diyafragmada anatomik defektlerle karakterize doğumsal bir anomalidir (1, 3, 4). Canlı doğan yenidoğanlarda mortalite %10-35 arasında değişmektedir. Gerçek mortalite ise antenatal ölümler ve gebeliğin terminasyonu nedeniyle daha yüksektir. Ölümlerin en önemli sebebi, herni gelişen tarafta daha belirgin olmak üzere iki taraflı pulmoner hipoplazi ve pulmoner hipertansiyondur. Sürfaktan eksikliği, sol ventrikül disfonksiyonu, eşlik eden anomaliler ve agresif mekanik ventilasyona bağlı iatrojenik akciğer zedelenmesi de mortalitede rol oynar(69).

Önemli deneysel ve klinik araştırmalara rağmen KDH patogenezi tam açıklanamamıştır (72). Pulmoner hipoplazinin patogenezinde en çok kabul edilen görüş, embriyonik dönemde karın içi organların toraksa geçmesi sonucu akciğerlerin bası altında kalmasıdır. Harrison ve DeLorimer, koyunlarda yaptıkları çalışmalarda, bu görüşü destekleyici verileri sunmuşlardır (72). Iritani ise hipoplazinin sebebinin akciğerlerin karın içi organlar tarafından basıya uğraması değil, akciğerlerde zaten var olan patolojiden kaynaklandığını, diyafragmadaki defektin de bu patoloji sebebiyle geliştiğini ileri sürmüştür (12).

Günümüzde yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin gelişmesi, yüksek frekanslı ventilasyon ve EKMO'nun kullanılabilmesi, nitrik oksit ve surfaktan tedavilerine rağmen KDH'da mortalite hala oldukça yüksektir(36).Çeşitli farmakolojik ajanlar, intrauterin cerrahi girişim, neonatal akciğer transplantasyonu gibi girişimler gelecek için umut verici olmakla birlikte tedavideki yerleri sınırlıdır. KDH'nın en önemli mortalite sebebi akciğer hipoplazisidir. Bu patolojinin sebebini aydınlatmak, gelişimini önlemek, doğum öncesi ve doğumdan sonra tedavi etmek için pek çok deneysel ve klinik araştırma yapılmış olmasına rağmen etkin bir tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır. KDH'lı yenidoğanların tedavileri için

mevcut tüm yöntemler değerlendirildiğinde, bunların çok pahalı olması ve sonuçlarının yüz güldürücü olmaması sebebiyle yeni tedavi metotları arayışı içine girilmiştir (74,75).

KDH'nın tanısı prenatal dönemde konulabilmektedir. Prenatal tanılama oranları giderek artmakta ve yöntemler giderek gelişmektedir. Prenatal KDH tanısı, 12. haftaya kadar batın duvarı ve diyafragmanın kapanmış olması gerekmekte olduğundan, en erken gestasyonun 12. haftasının sonunda konulabilmektedir. Avrupa'da çok merkezli bir çalışmada KDH'nin ortalama prenatal tanılama haftası 24,2 ve tanılama oranı %60'lara ulaşmaktadır.

Bazı farmakolojik ajanların gebelik döneminde anneye uygulanması yoluyla akciğer matürasyonunun prenatal dönemde hızlandırılması üzerinde yoğunlaşmış ve bu konuda deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bunun için kullanılan ilaçlar plasentadan geçebilmektedir. Glukokortikoidler ve tiroid hormonları gibi bir kısım hormonların akciğer matürasyonunda etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunlardan baska, EGF, glutatyon, vitamin A, C, E ve NAC ile de çalışmalar yapılmıştır (74, 75, 76, 79, 84). Bu deneysel çalışma ile NAC ve D vitamininin antenatal verilmesinin pulmoner hipoplaziye azaltma yönündeki etkinliğinin değerlendirilmesi ve pulmoner hipoplazide D vitamini ile NAC'ın sinerjik etkisi olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Deneysel olarak KDH oluşturmak için çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Bunlardan nitrofen kullanılarak diyafragma hernisi oluşturulan modelde insan modellerine benzerlik çok yakındır. Nitrofenin hayvanlarda KDH oluşturabildiği ilk defa 1981 yılında Nakao ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. KDH ve akciğer hipoplazisi ile ilgili deneysel çalışmalardan sonra artmaya başlamıştır. Nitrofenin teratojenitesinin mekanizmasına ait öne sürülen en yaygın görüş; nitrofenin ya tiroid bağlayan globulin ile yarışarak serbest tiroid hormon seviyesinin yükselmesine neden olması ya da direkt olarak embriyodaki tiroid hormon reseptörlerini stimüle etmesidir (74,75,76).

Yavru ratlarda KDH oluşturmak için anne rata hamileliğinin kaçınıcı günü ve ne kadar nitrofen verilmesi gerektiği konularında Kluth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar yol gösterici olmuştur. Bu konuda yapılan deneysel çalışmaların çoğunda, çalışmamızda da uygulandığı gibi gebe ratlara hamileliğin 9,5'uncu günü 200 mg nitrofenin gavaj yoluyla verilmesi ile yüksek oranda sol posterolateral diafragma hernisi oluşmuştur. Iritani ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada ise ratlara gebeliğinin 5-15'inci günleri arasında devamlı olarak nitrofen verilmiş ve yavru ratların %80'inde KDH gelişmiştir. Kluth ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gebeliğinin 10'uncu ya da 11'inci günü nitrofen verilmesi ile sağ KDH oluşturulabileceği bildirilmektedir (13). İnsanlarda sol posterolateral diyafragma

hernisinin en sık görülen KDH tipi olması sebebiyle bu çalışmada, Kluth ve arkadaşlarının tarif ettiği ve çoğunlukla sol diyafragma hernisi oluşturulan deney modeli tercih edildi ve sol diyafragma hernisi dışındaki diyafragma hernisi oluşan denekler çalışma dışı bırakıldı. Nitrofen kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda bildirilen KDH oluşma oranı, %20-80 arasında değişmektedir. Çalışmamızda bu oran literatürle uyumlu olarak %58.20 idi. Oluşan KDH, yavru ratların %73.07'sinde solda, %17.94'ünde sağda %8.97'sinde ise bilateral idi. Bu sonuçlar Kluth ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemin yüksek oranda KDH oluşturmak için uygun olduğunu bir kez daha göstermektedir (74).

Yapılan çalışmalardan bir kısmında pulmoner hipoplaziyi düzeltmek amaçlı kullanılan farmakolojik ajanların kullanımı sonrası akciğer ağırlıklarında artış bulunmuş, bir kısmında ise değişim izlenmemiştir. Çalışmalarda akciğer /vücut ağırlığı oranında artış olduğu da gösterilmiştir (5,6). Çalışmamızda herni tarafı akciğer ağırlıklarının ve akciğer /vücut ağırlığı oranlarının tedavi gruplarında anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Bu bulgular NAC ve D vitamininin pulmoner hipoplaziyi azalttığını morfolojik olarak göstermiştir.

KDH'da görülen immatür akciğerlerde, bronşiyal dallanmada azalma, pulmoner arteriollerin düz kas hücrelerinde artış, alveolar gelişiminde gerilik yanında akciğer damarlanmasında da anormallik olduğu bilinmektedir. Özellikle pulmoner arteriyollerin adventisya ve media tabakalarında düz kas hücrelerindeki artış dikkat çekicidir (78). Normal bir akciğer gelişimi için, normal bir akciğer damarlanmasının olması gerekmektedir. Guilbert ve arkadaşları, nitrofen kullanarak KDH oluşturdukları ratlarda, hipoplazik akciğerleri, histopatolojik olarak değerlendirmişler ve kontrol grubuyla karşılaştırmışlardır (71). Nitrofen verilen grupta alveolar septaların kalınlığının, kontrol grubuna göre belirgin derecede arttığını ve kontrol grubunda epitel tipinin, çoğunlukla matür yapıdaki küboidal epitel, nitrofen grubunda ise immatür yapıdaki kolumnar epitel olduğunu ve interstisyumun nitrofen grubunda azaldığını göstermişlerdir (75). Bu çalışmada, grup 2'deki ratların akciğer kesitleri histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, her iki akciğerde de, alveolar septalarda belirgin kalınlaşma tespit edildi. Aynı zamanda pulmoner epitelin sıklıkla immatür yapıdaki kolumnar epitel, olması dikkat çekiciydi. Ayrıca interstisyum belirgin artmıştı. Grup 2'deki histopatolojik değişiklikler, ratlarda nitrofen modeli ile KDH oluşturulmuş çalışmalardaki, hipoplazik akciğerlerin histopatolojik değişikliklerine uymakta idi.

Çalışmamızda grup 3, 4 ve 5'de ise alveolar septalardaki kalınlık grup 2'ye kıyasla belirgin olarak azalmıştı ve epitel çoğunlukla küboidal yapıda, interstisyum genellikle normal idi. Grup 1'de alveolar septalar normal kalınlıkta, epitel sıklıkla küboidal yapıda idi. Gruplar arasındaki fark anlamlı idi. Grup 3, grup 4 ve grup 5 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak

anlamli farklılık bulunmamıştır. Yapılan farklı çalışmalarda da nitrofen ile KDH oluşturulan ratlarda NAC'ın alveoler epitel maturasyonunu olumlu yönde etkilediği ve septal kalınlıklarda azalma sağladığı gösterilmiştir(76). Histopatolojik değerlendirme sonuçlarımız NAC'ın ve D vitamininin nitrofen etkisiyle KDH oluşturulmuş ratlarda akciğer maturasyonunu histopatolojik olarak olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre D vitamini ve NAC'ın birlikte verilmesinin ayrı ayrı verilmesine göre bir üstünlüğü görünmemektedir.

Fisher ve arkadaşları ratlarda yaptıkları in vitro çalışmada, nitrofen ile KDH oluşturdukları ve 13,5. günde aldıkları embriyo ratların akciğerlerini, iki gruba ayırarak organ kültürlerine yerleştirmişler, bir gruba dört gün boyunca NAC vermişlerdir. Dördüncü gün sonunda fetal akciğerleri morfolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. NAC'ın, in vitro olarak hipoplastik fetal akciğer gelişimini uyardığını ve özellikle fetal akciğer organ kültürlerinde NAC'ın hava yolu alanını, çevresini, akciğer tomurcuk sayısını ve indirgenmiş glutasyon seviyelerini belirgin olarak arttırdığını bildirmişlerdir (7).

NAC kullanımı ile ilgili deneysel araştırmalarda, NAC'ın değişik doz ve veriliş yolları bildirilmiştir. Kluth ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, gebe ratlara nitrofen verdikten sonra, 13. günden başlayarak 21'inci güne kadar toplam 480 rat embriyosunu diyafragma ve akciğer gelişimi yönünden incelemişler ve sonuçta 14 günlük embriyo ratta diyafragmada defekt olduğunu, akciğerlerde hipoplazi bulgularının ise 17'inci günden itibaren görülmeye başladığını bildirmişlerdir (59, 60, 62, 81). Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada NAC, nitrofenin verildiği gebeliğin 9,5. gününden itibaren, intraperitoneal yolla, 40mg/kg dozunda ve dörtgün süre ile verilmiş ve hipoplaziye olumlu etkileri gösterilmiştir (7,78).

D Vitamini, kalsiyum hemostazındaki rolü uzun zamandır bilinen önemli bir steroid hormondur. Fonksiyonlarının çoğu nükleer vitamin D reseptörü (VDR) üzerinden gerçekleştirilir. Kemik dışında hemen her hücrede (beyin, kalp, mide, pankreas, deri, meme, gonadlar, T ve B lenfositleri, monositler, akciğerler vs.) VDR tespit edilmesi ile D vitamininin kemik metabolizması dışındaki diğer dokuların fonksiyonlarında da önemli rolü olduğu ve astım başta olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda D vitamininin; astım gelişimi, astım alevlenme nedeni olan solunum yolu enfeksiyonları, akciğer fonksiyonları, astım ciddiyeti, total IgE ve eozinofil sayısı, antienflamatuar tedavi ihtiyacı gibi birçok faktörle olan ilişkisi araştırılmıştır. D vitaminin astım patogenezi; immün fonksiyonları iyileştirerek, antienflamatuar etki göstererek, steroid direncini azaltarak, glukokortikoidlerin etkilerini güçlendirerek, hücre döngüsünü



yavaşlatarak ve remodelingi azaltarak katkıda bulunduğu düşünülmektedir (64, 65 ,66, 79, 80).

D vitaminin epitel hücreleri ve fetal akciğer gelişiminde önemli etkisi olduğu, fetal akciğer gelişiminde anahtar rolü olan tip 2 alveolar hücrelerin maturasyonunu ve pulmoner sürfaktan sentezini indüklediği gösterilmiştir (80). Yapılan bir çalışmada vitamin D eksikliğinde dişi farelerde azalmış akciğer hacmi, azalmış akciğer parankimi ve incelmış alveolar septa saptanmıştır (80,81). Yapılan çalışmalarda 1,25(OH)2D vitaminin 1 mcg/kg dozunda erişkin ratlara uygulanmasıyla pulmoner değişimi olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (80). Çalışmamızda, 1 mcg/kg/gün dozunda 4 gün süre ile gebe ratlara hamileliğin son trimesterinde verilen D vitamini ile KDH'li doğan yavru ratlarda histolojik olarak alveolar matürasyonun arttığı, septal kalınlığının azaldığı ve interstisyum miktarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunun azaldığı ve SP-A düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre D vitamini KDH'de pulmoner hipoplaziyi azaltmaktadır.

TGF- $\beta$ 1 proteini TGF beta süperfamilyasının üyesidir. TGF- $\beta$ 1 ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesinde, epitelyum oluşumunda ve fibrozis ile yeniden modellenmede rol oynar. TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunun embriyogenezis sırasında oluştuğunu gösteren çalışmalar vardır. Leinwand ve arkadaşları nitrofen ile konjenital diyafragma hernisi oluşturulan ratlarda TGF- $\beta$  stimülasyonunun etkilenmediğini düşünseler de Chang Xu ve arkadaşları tetrandrine uygulamasının TGF- $\beta$  değerlerini değiştirdiğini göstermişlerdir (10). Birçok çalışma TGF- $\beta$ 1'in akciğer hipoplazisinde rol oynadığını göstermiştir. Dışarıdan eksojen olarak akciğer kültürlerine TGF- $\beta$ 1 verilmesinin akciğer hipoplazisine yol açtığı gösterilmiştir. TGF- $\beta$ 1, negatif etki ile bronşial dallanmayı azaltmaktadır (79,82).

Çalışmamızda TGF- $\beta$ 1 ile boyanma oranlarına bakıldığında sol akciğerlerde Grup 1'de hiç boyanma izlenmedi. Grup 2' de diğer gruplara oranla artmış boyanma izlendi. Grup 4'te ise grup 3 ve 5'e oranla anlamlı olarak artmış boyanma izlendi. Bu sonuçlara göre TGF- $\beta$ 1 düzeyleri nitrofen ile artarken D vitamini ve NAC kullanımıyla azalmaktadır. TGF- $\beta$ 1 düzeyleri üzerine en belirgin etki ise NAC ve NAC+D vitamini kullanımında gözlenmiştir. Daha önce yapılan farklı çalışmalarda TGF- $\beta$ 1'in anormal proliferasyonu ile bronkodisplazi oluştuğu gösterilmiştir. Nitrofen ile KDH oluşturulan ratlarda estrogenin akciğer hipoplazisini azalttığının gösterildiği bir çalışmada TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin azaldığı da gösterilmiştir(82). Çalışmamız ile daha önce akciğer hipoplazisini azaltmada farklı belirteçlere göre fayda sağladığı gösterilmiş NAC'ın TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda D

vitamini ile de TGF- $\beta$ 1 düzeyleri nitrofen grubuna göre azalmakla birlikte NAC ve NAC+D vitamini grubu kadar etkili olmaması dikkat çekicidir.

Bazı araştırmacılar, TGF- $\beta$ 1'in normal akciğer gelişimi ile ilişkili olduğunu ancak fazla ekspresyonunun da pulmoner hipoplaziye neden olabileceğini söylerken bazılarıda pulmoner hipoplazide oluşan sorunu ortadan kaldırmak ve remodilasyonu sağlamak amaçlı TGF- $\beta$ 1'in arttığını söyler. TGF- $\beta$ 1 epitelyal hücre proliferasyonunu inhibe eder(82). Bizim çalışmamızda da nitrofen ile KDH oluşturulmuş, dolayısıyla pulmoner hipoplazi izlenen ratlarda TGF- $\beta$ 1 düzey artmış bulunurken pulmoner hipoplaziyi azaltmak için kullandığımız ajanlarla bu oran azalmıştır.

Akciğerlerin farklılaşma ve olgunlaşmasında surfaktan önemlidir. Yapılmış çalışmalar, surfaktan yetersizliğinin KDH fizyopatolojisinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Koyun ve fare modellerinde KDH'de surfaktan fosfolipidlerine karşı direnç gösterilmiştir. Mekanizması çok açık bilinmemekle birlikte surfaktan üretimi ve akciğer matürasyonunun bir takım endojen faktörler tarafından başlatıldığı düşünölmektedir. Surfaktan sisteminin gelişimi, katalaz, glutasyon peroksidaz ve superoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin artışı ile aynı zamanlara uymaktadır (77,78). Bu durum antioksidan enzimlerin akciğer gelişimi ile dolaylı ilişkisini düşöndürmektedir. Araştırmacılar bu düşönce ile bir kısım antioksidan ajanların akciğer gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Thebaub ve Tibboel ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada, A vitamininin, nitrofeneye bağlı KDH sıklığını ve şiddetini azalttığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, ratlarda yaptıkları daha sonraki bir çalışmada, A vitamininin, nitrofeneye bağlı KDH'da surfaktan sentezi üzerinde onarıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yine glutasyon, vitamin C ve E'nin fetal akciğer büyümesini hızlandırdığı yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (83,84).

Hayvan modellerinden ve klinik raporlardan elde edilen bilgiler KDH ile doğan yenidoğanlarda azalmış akciğer kompliansı, hyalin membran formasyonu ve surfaktan direnci gözlendiğini ortaya koymuştur. Surfaktan Tip 2 pnömositlerden salgılanan ve akciğer gelişimini artıran bir proteindir. Surfaktan sentezi geç gestasyonda olur. İnsan fetuslarında 20-22. haftada teminal keslerde tip-2 epitelyal hücreler görölsede, amniyotik sıvıda surfaktan sekresyonu 30-32. gestasyonel haftada görölür. SP-A'nın KDH'lı bebek bekleyen gebelerdeki amniyotik konsantrasyonu ile prognoz arasında ilişki vardır. Asabe ve arkadaşları KDH'li bebeklerde azalmış surfaktan salınımı olduğunu belirtmişlerdir(11,84). Bizim çalışmamızda, SP-Adüzeyi grup 1'de beklenileceği gibi artmış boyanma (%100) olarak gözlenmiş, grup 2'de ise büyük oranda hiç boyanma gözlenmemiştir (%83). Grup 3'de %20, grup 4'de % 36 ve grup 5'de %63 oranında artmış boyanma izlenmiştir. Grup 3 ve 4'deki artmış boyanma grup

2'ye göre, Grup 5'deki artmış boyanma da grup 3 ve 4'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda fetal oklüzyon yapılan ratlarda surfaktan düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da TET verilerek akciğer hipoplazisi azalan ratlarda surfaktan salgılanmasının arttığı gösterilmiştir(85). Bizim çalışmamızda da NAC ve D vitamininin ayrı ayrı kullanımının surfaktan A düzeyini arttırdığı, her ikisinin birlikte kullanımının ise surfaktan düzeyinin artışı üzerine daha etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda, nitrofen ile KDH oluşturulan ratlarda, prenatal dönemde verilen D vitamininin pulmoner hipoplaziyi azaltma yönünde olumlu etkisi olduğu, ancak etkinliği daha önce yapılan çalışmalarla da gösterilmiş NAC'a bir üstünlüğü olmadığı görülmüştür. D vitamini ve NAC'ın birlikte kullanımı ile SP-A düzeylerinde ayrı ayrı kullanımlara göre anlamlı artış gözlenmiş ancak bu olumlu etki histopatolojik olarak ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde gözlenmemiştir. Bu nedenle her ne kadar bu iki ajanın birlikte kullanımının daha etkili olduğu bu çalışmayla söylenememekle birlikte surfaktan düzeylerindeki bu anlamlı artışın daha ileri çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

## SONUÇLAR

1.Nitrofen ile diyafragma hernisi oluşturulan model insan fizyolojisine benzerlik göstermesi nedeniyle uygun bir seçimdir.

2.Nitrofen erişkin ratlara yüksek toksisite göstermemekle birlikte, gebe ratlarda teratojenik özelliktedir.

3.KDH'da oluşan pulmoner hipoplaziye bağlı morfolojik, histopatolojik ve immunohistokiyasal değişiklikler izlenir.

4.NAC diyafragma hernisinde oluşan pulmoner hipoplaziyi azaltmada etkili bir ajandır.

5.D vitamini pulmoner hipoplaziyi azaltmada etkili bir ajandır.

6.NAC ve NAC+D vitamini grubunda TGF- $\beta$ 1 ile D vitamini grubuna göre daha aza boyanma izlenmiştir. Fakat diğer bulgular açısından D vitamini ve NAC grubunda farklılık yoktur. Bu sonuçlara göre NAC ve D vitaminin pulmoner hipoplaziyi azaltmada birbirine üstünlükleri çalışmamızda net olarak görülmemiştir.

7.NAC+D vitamini kullanımı ile NAC ve D vitaminin ayrı ayrı kullanımına göre morfolojik, histopatolojik ve TGF- $\beta$ 1 ile boyanma açısından üstünlük görülmemiş,sadece SP-A ile boyanmada artış izlenmiştir.NAC ve D vitaminin birlikte kullanımın ayrı ayrı kullanımlarına bir üstünlüğü olup olmadığı çalışmamızdaki çelişkili sonuçlar nedeniyle net olarak değerlendirilememiş olup ek çalışmalara gerek vardır.

8.TGF- $\beta$ 1 hücre düzenlenmesinde negatif bir ajandır ve fibrozisi artırır. KDH'de oluşan pulmoner hipoplaziye bağlı nitrofen grubunda TGF- $\beta$ 1 artarken, NAC ve D vitamini kullanımı bu artışı sınırlar.

9.SP-A tip 2 pnömositlerden salınan surfaktanın bir tipi olup, hastanın pumoner gelişiminin iyi olduğunun göstergesi olan bir belirteç olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Kluth D, Tenbrinck R, Ekespare M. The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in embryo. *J Pediatr Surg* 1993;28:456-463.
2. Sadler TW. *Medical Embryology* (5th ed). Williams and Wilkins, Baltimore, 1990.
3. Chinoy MR, Chi X, Cilley RE, et al. Down- regulation of regulatory proteins for differentiation and proliferation in murine fetal hypoplastic lungs: Altered mesenchymal-epithelial interactions. *Pediatr Pulmonol* 2001;32:129-141.
4. Coleman C, Zhao J, Gupta M, et al. Inhibition of vascular and epithelial differentiation in murine nitrofen- induced diaphragmatic hernia. *Am J Physiol* 1998;274:636-646.
5. İslam S, Nara V, Cote GM, et al. Prenatal vitamin E treatment improves lung growth with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1999;34:172-177.
6. Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, et al. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *J Pediatr Surg* 1995;30: 420-426.
7. Fisher JC, Kling DE, Kinane TB, et al. Oxidation- reduction (redox) controls fetal hypoplastic lung growth. *J Surg Res* 2002;106: 287-291.
8. Flanagan RJ, Meredith TJ, et al. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am J Med.* 1991;91:131-139.
9. Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E. Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D Hypothesis. *Allergy* 2011;67:10-17.
10. Chang Xu, Wenying Liu. Effects of prenatal tetrandrine administration on transforming growth factor- $\beta$ 1 level in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *J Pediatr Surg* 2009;44:1611-1616.

11. Asabe K, Tsuji K, Handa N, et al. Immunohistochemical distribution of surfactant apoprotein A in congenital diaphragmatic hernia-II. *J Pediatr Surg* 2006;32: 667-672.
12. Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol* 1984;169:133-139.
13. Kluth D, Keijzer R, Hertl M. Embryology of congenital diaphragmatic hernia. *Seminars in Pediatric Surgery* 1996;5:224-233.
14. DiFiore JW, Wilson JM. Lung development. *Semin Pediatr Surg* 1994;3:221-223.
15. Inselman LS. Growth and development of the lung. *J Pediatr* 1981;98:1-15.
16. Yamataka T, Puri P. Pulmonary artery structural changes in pulmonary hypertension complicating congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997;32:682-687.
17. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi Cilt 1 (2. baskı)*. Günes Kitabevi, Ankara 1997.
18. Moore KL. *Clinicaly Oriented Anatomy (3th ed)*. Williams and Wilkins, Baltimore 1992.
19. Snell RS. *Clinical Anatomy For Medical Students (2nd ed)*. Little, Brown and Company, Boston 1981
20. Stolar CJH, Dillon PW. Congenital diaphragmatic hernia and eventration. In: O'Neill JA, Rowe MI (eds), *Pediatric Surgery (5th ed)*. Mosby Year Book, 1998, pp. 819-837.
21. Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr* 2002;14:486-490.
22. Tibboel D, Gaag AV. Etiologic and genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatal* 1996;23: 689-699.
23. Warkany J, Roth CB. Malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. *J Nutr* 1948;35:1-3.

24. Adelman Sand Benson CD. Bochdalek hernias in infants: Factors determining mortality. *J Pediatr Surg* 1976;11:569-573.
25. Anderson KD. Congenital Diaphragmatic Hernia. In: Welch KJ, Randolph JG, Ravitch MM (eds), *Pediatric Surgery* (2nd ed). Year Book Medical Publishers, Chicago 1986, pp. 589-601.
26. Cullen ML, Klein MD, Philippart AI. Congenital diaphragmatic hernia. *Surg Clin North Am* 1985;65:115-138.
27. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, et al. Diaphragmatic hernia in the fetus: Prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg* 1985;20:357-361.
28. Butler N, Claireaux AE. Congenital diaphragmatic hernia as a cause of perinatal mortality. *Lancet* 1962;1:659-663.
29. Greenwood RD, Rosenthal A, Nadas AS. Cardiovascular abnormalities associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 1976;57:92.
30. Hansen J, James S, Burrington J, et al. The decreasing incidence of pneumothorax and improving survival of infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1984;19:385-388.
31. Puri P, Gorman F. Lethal non-pulmonary anomalies associated with congenital diaphragmatic hernia: Implications for early intrauterine surgery. *J Pediatr Surg* 1984;19:29-32.
32. Gray SW, Skandalakis JE. *Embryology For Surgeons* (2nd ed). Saunders, Philadelphia 1972.
33. Bremer JL. The diaphragm and diaphragmatic hernia. *Arch Path* 1943;36:539-549.

34. Arensman RM, Banbini DA. Congenital diaphragmatic hernia and eventration. In: Ashcraft KW, Murphy JP, Sharp RJ, Sigalet DL (eds), *Pediatric Surgery* (3th ed). WB Saunders Company, Philadelphia 2000, pp.300-317.
35. Kluth D, Kangah R, Reich P, et al. Nitrofen induced diaphragmatic hernias in rats: An animal model. *J Pediatr Surg* 1990;25:850-854.
36. Harrison MR, de Lorimier AA. Congenital diaphragmatic hernia. *Surg Clin North Am* 1981;61:1023-1035.
37. Kitagawa M, Hislop A, Boyden EA, et al. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia: A quantitative study of airway, artery and alveolar developments. *Br J Surg* 1971;58:342-346.
38. Özcan C. Konjenital Diyafragma Hastalıkları. Yüksel M, Kaptanoğlu M. (ed). *Pediyatrik Göğüs Cerrahisi*. Golden Print, İstanbul, 2004, s: 399-419.
39. Nital D, Stolar CJ, Dillon PW. Congenital Diaphragmatic Hernia and Eventration. O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JJ, Fonkalsrud EW, Coran AG, *Pediatric Surgery*, 6th ed. St. Louis, Mosby-Year Book Inc., 2006, pp:931-946.
40. Irish MS, Holm BA, Glick PL: Congenital diaphragmatic hernia. A historical review. *Clin Perinatol* 1996 Dec; 23(4): 625-653
41. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Nakayama DK, Manning FA, de Lorimier AA. Diaphragmatic hernia in the fetus: prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg* 1985;20: 357– 361.
42. Skari H, Bjornland K, Haugen G, et al. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000; 35:1187–1197.
43. May DA, Barth RA, Yeager S, et al. Perinatal and postnatal chest sonography. *Radiol Clin North Am* 1993;31:449-516.



44. Lipshutz GS, Albanese CT, Feldstein VA, et al. Prospective analysis of lung-to-head ratio predicts survival for patients with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32:1634–1636.
45. Osada H, Kaku K, Masuda K, et al. Quantitative and qualitative evaluations of fetal lung with MR imaging. *Radiology* 2004; 231:887–892.
46. Smith NP, Jesudason EC, Featherstone NC, Corbett HJ, Losty PD. Recent advances in congenital diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child* 2005;90:426–428.
47. Bohn DJ. Ventilatory management and blood gas changes in congenital diaphragmatic hernia. In: Puri P (eds). *Modern Problems in Pediatrics*. Basel: Karger 1989, pp. 76-89.
48. Bos AP, Tibboel D, Hazebroek FW: Surfactant replacement therapy in high-risk congenital diaphragmatic hernia. *Lancet* 1991 Nov; 16; 338(8777): 1279
49. Glick PL, Leach CL, Besner GE, et al: Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia. III: Exogenous surfactant therapy for the high-risk neonate with CDH. *J Pediatr Surg* 1992 Jul; 27(7): 866-869.
50. Al-Shanafey S, Giacomantonio M, Henteleff H. Congenital diaphragmatic hernia: Experience without extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Surg Int* 2002;18:28-31.
51. Bianchi A, Doig CA, Cohen SJ. The reverse latissimus dorsi flap for congenital diaphragmatic hernia repair. *J Pediatr Surg* 1983;18:560-563.
52. De Kort LM, Bax KM. Prosthetic patches used to close congenital diaphragmatic defects behave well: A long-term follow-up study. *Eur J Pediatr Surg* 1996;6:136-138.

53. Shah AV, Shah AA. Laparoscopic approach to surgical management of congenital diaphragmatic hernia in the newborn. *J Pediatr Surg* 2002;37:548-550.
54. Dinger J, Peter-Kern M, Goebel P, et al. Effect of PEEP and suction via chest drain on functional residual capacity and lung compliance after surgical repair of congenital diaphragmatic hernia: Preliminary observations in 5 patients. *J Pediatr Surg* 2009;212-216
55. Grethel EJ, Nobuhara KK. Fetal surgery for congenital diaphragmatic hernia. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2006; 42: 79–85.
56. Li J, Hu T, Liu W, et al. Effect of epidermal growth factor on pulmonary hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004;39:37-41
57. Manson JM. Mechanism of nitrophen teratogenesis. *Environ Health Perspect* 1986;70:137-147.
58. Burke Hurt SS, Smith JM, Hayes AW. Nitrofen: A review and perspective. *Toxicology* 1983;29:1-37.
59. Gregory S, Kelly ND. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med.Rev* 1998;3:114-128.
60. Cortijo J, Cerda NM, Serrano AG, et al. Attenuation by oral N- acetylcysteine of bleomycin induced lung injury in rats. *Eur Respir J* 2001;17:1228-1235.
61. Hebert S, Haibo Z, Christian D, et al. Does N- acetylcystein influence cytokine response during early human septic shock? *Chest* 1998;113:1616-1624.
62. Uçgun A. Ekspektoran ve antitüssif ilaçlar. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Sayısı* 2003;1:288-301.

63. Berraies A, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Link between vitamin D and airway remodeling. *J Allergy* 2014;7:23-30.
64. Zosky GR, Berry LJ, Elliot JG, James AL, Gorman S, Hart PH. Vitamin D deficiency causes deficits in lung function and alters lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1336-1343.
65. Bosse Y, Maghni K, Hudson TJ. 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiol Genomics* 2007;29:161-168.
66. Li J, Hu T, Liu W, et al. Effect of epidermal growth factor on pulmonary hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004;39:37-42.
67. L, Dey CR, Wert SE, et al. Arrested lung morphogenesis in transgenic mice bearing an SP-C TGF-beta 1 chimeric gene. *Dev Biol* 1985;175:227-38.
68. Zhao J, Bu D, Lee M, et al. Abrogation of transforming growth factor beta type 2 cell receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol* 1996;180:242-57.
69. Bratu B, Flageole H, et al. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia 2001; pp:122-127.
70. Cockshutt AM, Possmayer F. Metabolism of surfactant lipids and proteins in the developing lung. Elsevier Science Publishers:1992; pp:339-377.
71. Guilbert TW, Gebb SA. Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:1159-1171.

72. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW. Congenital diaphragmatic hernia: An unsolved problem. *Semin Pediatr Surg* 1993;2:109-112.
73. Pacheco BA, Islam S, Sung PK. Antioxidants reverse fetal rat pulmonary hypoplasia in vitro. *Surg Forum XLVIII* 1997.
74. Islam S, Narra V, Manganaro T. Prenatal vitamin E, treatment improves lung growth in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1999;34:172.
75. Gonzalez S, Alvarez L, Tovar JA. Prenatal vitamin E improves lung and heart hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 2003;19:331-334.
76. Asabe K, Tsuji K, Handa N, et al. Immunohistochemical distribution of surfactant apoprotein A in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997;32:667-672.
77. Ijsselstijn H, Tibboel D. The lung in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric Pulmonology* 1998;26:204-218.
78. Horowitz RS, Dart RC, Jarvie DR. Placental transfer of N-acetylcysteine following human maternal acetaminophen toxicity. *Toxicol Clin Toxicol* 1997;35 (5):447-451.
79. Corduk N, Abban G, Yildirim B, Sarioglu-Buke A. The effect of vitamin D on expression of TGF  $\beta$ 1 in ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Sep;120(8):490-3.
80. Foong RE, Shaw NC, Berry LJ, Hart PH, Gorman S, Zosky GR. Vitamin D deficiency causes airway hyperresponsiveness, increases airway smooth muscle mass, and reduces TGF- $\beta$  expression in the lungs of female BALB/c mice. 2014 Mar 27;2(3):276-282

81. Berraies A, Hamzaoui K, Hamzaoui A Link between vitamin D and airway remodeling Journal of Asthma and allergy 2014;7:23-30.
82. Murine Nitrofen İnduced Pulmonary Hypoplasia Does Not İnvolve İnduction of TGF- $\beta$  Signaling J. Ped. Surgery 2002;37:1123-1127.
83. Thebaud B, Tibboel D, Bourbon JR. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen- induced congenital diaphragmatic hernia rats. Am JPhysiol 1999;277:423-429.
84. Thebaud B, Tibboel D. Restoring effects of vitamin A on surfactant synthesis in nitrofen- induced congenital diaphragmatic hernia rats. Am J Respir 2001;164:1083-1089.
85. Gong Chen, Yinli Qiao, Xianmin Xiao, Shan Zheng, Lian Chen Effects of estrogen on lung development in a rat model of diaphragmatic hernia J. Ped. Surgery 2010;45:2234-2235.
86. Akgül A. Tıbbi araştırmalarda istatistik analiz teknikleri, Yüksek Eğitim Kurumu Matbaası, Ankara 1997.

## EKLER

Tablo 7:Sağ akciğerlerde epitel tipleri

Sağ akc.	GRUPLAR
----------	---------

epitel tipi	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup5 n (%)
Matür	8 (% 0)*	2 (%33,3)**	21(%72,4)	9 (%81,8)	8 (%72,7)
İmmatür	0 (%0)	4 (%66,7)	8 (%24,1)	2 (%27,2)	3 (%27,3)
Toplam	8 (%100)	6 (%100 )	29(%100)	11(%100)	11(%100)

\*Grup 1’de akciğer maturasyonu diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak matür lehine.(p<0,05)

\*\*Grup 2’de akciğer maturasyonu diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak immatür lehine (p<0,05).

Tablo 8: Sağ akciğerlerde alveolar septal kalınlıklar

Alveolar Septal Kalınlık	GRUPLAR				
	Grup1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Normal	8 (%100)	2 (%33,3)	22 (%75,9)	9(% 81,8)	7(%63,6)
Artmış	0 (%0)	4(%66,7)*	7 (%24,1)	2(%11,2)	4(%36,4)
Azalmış	0 (%0)	0 (%)	0 (%0)	0 (%)	0 (%)
Toplam	8	6	29	11	11

\*Grup 2’de diğer gruplara oranla artmış alveolar kalınlık izlendi (p<0,05).

Tablo 9: Sağ akciğerlerde interstisyum miktarları

İnterstisyum	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup n (%)
Normal	8 ( %100)	1 (%16,6)	21(%72,4)	9(%81,8)	8(%72,7)

Artmış	0 (% 0 )	1 (% 16,6)	0 (% 0)	0 (%0)	0 (%0)
Azalmış	0 ( %0 )	4 %66,8)*	8 (% 27,6)	2(% 11,2)	3(%57,3)
Toplam	8	6	29	11	11

\*Grup 2’de interstisyum diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak azalmış (p<0,05).

Tablo 10: Sağ akciğerlerde TGF-  $\beta$ 1 ile boyanma düzeyleri

TGF- $\beta$ 1	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Grade 0	8 (%100)	0 (% 0)	18 (%62)	6 (%54,5)	8 (%77,8)
Grade 1	0 (%0)	2 (%33,3)	6 (%20,6)	3 (%27,3)	1 (% 9)
Grade 2	0 (%0)*	4 (% 6,7) **	5(% 17,3)	2 (% 18,2)	2 (%18,2)
Toplam	8	6	29	11	11

\*Grup 1’de boyanma yok.

\*\*Grup 2’de diğer gruplara oranla artmış boyanma izlendi.

Tablo 11: Sağ akciğerlerde Surfaktan protein A ile boyanma düzeyleri

SP-A	GRUPLAR				
	Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	Grup 3 n (%)	Grup 4 n (%)	Grup 5 n (%)
Grade 0	0 (% 0)	4 %66,7)	8 (%27,6)	2(%18,2)	2 (% 18,2)
Grade 1	0( %0)	2 %33,3)	8 (%27,6)	3 (%27,3)	2 (% 18,2)
Grade 2	8(%100)**	0 (%0)*	13(%44,8)	6 (%54,5)	7(%63,6)**
Toplam	8	6	29	11	11

\*Grup 2’de diğer gruplara oranla anlamlı azalmış boyanma

\*\*Grup 1 ve 5’te grup 3 ve 4’e oranla artmış boyanma