

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

**YENİDOĞANIN DENEYSEL HİPEROKSİK
AKCİĞER HASARI MODELİNDE
KLARİTROMİSİN, MONTELUKAST VE
PENTOKSİFİLİN TEDAVİLERİNİN
HİSTOLOJİK DÜZEYDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. KORCAN DEMİR

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ABDULLAH KUMRAL

İZMİR – 2007

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

**YENİDOĞANIN DENEYSSEL HİPEROKSİK
AKCİĞER HASARI MODELİNDE
KLARİTROMİSİN, MONTELUKAST VE
PENTOKSİFİLİN TEDAVİLERİNİN
HİSTOLOJİK DÜZEYDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. KORCAN DEMİR

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ABDULLAH KUMRAL

**Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı (Proje no: 2005 KB SAG 36, 2005 301) ve
TÜBİTAK (Proje No: SBAG-HD-76, 105S336) tarafından desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| Kısaltmalar | iii |
| Özet | 1 |
| Summary | 3 |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 5 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 6 |
| 2.1 Tanım | 6 |
| 2.2 Tarihçe | 7 |
| 2.3 Görülme sıklığı | 7 |
| 2.4 Patofizyoloji | 8 |
| 2.4.1 Normal akciğer gelişimi | 8 |
| 2.4.2 Eski ve yeni BPD patolojisi | 9 |
| 2.4.3 Akciğer hasarı meydana geliş şekilleri | 10 |
| 2.5 Etyoloji / risk faktörleri | 11 |
| 2.6 Klinik bulgular ve prognoz | 13 |
| 2.7 Korunma | 14 |
| 2.7.1 Erken doğumun önlenmesi | 14 |
| 2.7.2 Doğum öncesi tedaviler | 14 |
| 2.7.3 Sürfaktan tedavisi | 14 |
| 2.7.4 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar | 15 |
| 2.7.5 Patent duktus arteriozusun kapatılması | 15 |
| 2.7.6 Sıvı tedavisi | 15 |
| 2.7.7 Enfeksiyonların tedavisi | 15 |
| 2.7.8 Mekanik ventilasyon uygulamaları | 15 |
| 2.7.9 Antioksidan ve beslenme tedavileri | 16 |
| 2.7.10 Umut verici yaklaşımlar | 16 |
| 2.8 Tedavi | 16 |
| 2.8.1 Oksijen/Vazodilatörler | 16 |
| 2.8.2 Diüretikler | 17 |
| 2.8.3 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar | 17 |
| 2.8.4 Mukolitikler | 17 |
| 2.8.5 Beslenme | 17 |
| 2.8.6 Glikokortikoidler | 17 |
| 2.8.7 İkincil hastalıkların önlenmesi | 17 |

| | |
|--|----|
| 2.8.8 Umut verici tedaviler | 18 |
| 3. YÖNTEM | 18 |
| 3.1 Hayvan modeli ve tedaviler | 18 |
| 3.1.1 Çalışma grupları | 19 |
| 3.1.2 İlaçların uygulanması | 19 |
| 3.2 Doku hazırlığı | 20 |
| 3.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi | 20 |
| 3.4 Alveolar alanın morfometrik ölçümü | 20 |
| 3.5 Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi | 22 |
| 3.6 Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler | 22 |
| 4. SONUÇLAR | 23 |
| 4.1 Kilo alımı | 23 |
| 4.2 Alveolar yüzey alanı ölçümü | 23 |
| 4.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi ve immünohistokimyasal SMA boyaması | 26 |
| 5. TARTIŞMA | 32 |
| 6. SONUÇLAR | 36 |
| 7. KAYNAKLAR | 37 |
| TABLOLAR | |
| Tablo 1. Bronkopulmoner displazi tanısıl kriterlerinin tanımlanması | 7 |
| Tablo 2. BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler | 10 |
| Tablo 3. BPD'nin prognozu | 14 |
| Tablo 4. Deneyde kullanılan ilaçların kullanım özellikleri | 20 |
| Tablo 5. Gruplara göre deney sonunda sıçan ağırlıklarının grup ortalamaları | 23 |
| Tablo 6. Gruplara göre ortalama alveol alanı değerleri | 24 |
| Tablo 7. Deney gruplarında fibrozis skorlarına göre dağılım | 27 |
| Tablo 8. Gruplara göre aktin skorları | 29 |
| ŞEKİLLER | |
| Şekil 1. Deney düzeneği | 19 |
| Şekil 2. Alveolar yüzey alanının değerlendirilmesi | 21 |
| Şekil 3. Alveolar yüzey alanının Paintbrush programı kullanılarak değerlendirilmesi | 21 |
| Şekil 4. Çalışma gruplarında alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri | 25 |
| Şekil 5. Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi | 30 |

KISALTMALAR

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim

BPD: Bronkopulmoner displazi

CPAP: Sürekli pozitif hava yolu basıncı

GH: Gestasyonel hafta

HFOV: Yüksek frekanslı ossilatuar ventilasyon

PDA: Patent duktus arteriozus

RDS: Respiratuvar distres sendromu

RSV: Respiratuvar Sinsityal Virüs

SMA: Düz kas aktin

SOD: Süperoksit dismutaz

TGF- α : Transforme edici büyüme faktörü α

TNF- α : Tümör nekroz faktörü α

VEGF: Vasküler epitelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ ve AMAC

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm bebeklerde görülen, akciğer dokusunda inflamasyon, fibrozis ve gelişim bozukluğu ve/veya duraklaması sonucunda ortaya çıkan kronik akciğer hastalığıdır. BPD, prematüre doğan bebeklerin tüm hayatı boyunca ciddi morbiditelere yol açar. Prematüre doğum, solunum yetmezliği, oksijen tedavisi ve mekanik ventilasyon, BPD gelişiminde dört temel risk faktörünü oluşturmaktadır (1, 2, 3).

BPD gelişimini önlemekte başarılı tek bir yöntem yoktur. Prematür doğumların engellenmesi, prenatal steroid tedavileri, postnatal dönemde sürfaktan, anti-inflamatuvar ajanlar, yeni mekanik ventilasyon stratejileri, antioksidan tedaviler ile hastalık şiddeti azaltılabilmektedir (4). BPD'nin önlenmesi ve tedavisi konusunda araştırmalar devam etmektedir.

Bronkopulmoner displazi tedavisinde, günümüzde etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamaktadır. Literatürde hiperoksi ile oluşturulan ve “yeni BPD”nin histolojik özelliklerini gösteren modellerde, tedavi etkinliğini değerlendiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu modelde özellikle kombine tedavilerin etkinliğini araştıran çalışma yoktur. Bu çalışmada amaç; klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin tedavilerinin hiperoksiye bağlı akciğer hasarının giderilmesindeki etkinliğini, histopatolojik düzeyde değerlendirmektir.

Lökotrienler inflamasyon yolağında görevli güçlü maddelerdendir. Mikrovasküler geçirgenliği ve mukus salgısını artırır, inflamatuvar hücre göçüne neden olur, nöronal uyarıda bulunur, bronş düz kasında kasılma ve proliferasyona neden olurlar. Lökotrienler çeşitli akciğer hastalıklarında patogenezinde rol oynamaktadır (5). Yenidoğan sıçanlarda hiperoksiye cevap olarak LTB4 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (6). Jouvencel ve arkadaşları 24. saatten itibaren hiperoksiye maruz bıraktıkları term yenidoğan sıçanlarda, 4–14. günlerde uyguladıkları montelukast tedavisinin alveolarizasyonun inhibisyonunda olumlu etkisi olmadığını bulmuşlardır, fakat çalışmalarında, BPD patolojik bulgularından fibrozis, ikincil krest oluşumu, damarsal değişiklikler, düz kas hiperplazisi gibi yeni BPD tanımında önemli kriterleri değerlendirmemişlerdir (7).

Pentoksifilin, bir ksantin türevi olup fosfodiesteraz inhibitörüdür. İnflamatuvar süreçten sorumlu birçok mediyatör üzerinde etkisi bulunmaktadır. Tümör nekroz faktörü (TNF) gen transkripsiyonunu ve IL-1 ve IL-10 düzeylerini azaltır; nötrofil fonksiyonları üzerine baskılayıcı etkileri vardır (8). İnsan veya hayvan çalışmalarında belirgin yan etkisi gözlenmeyen pentoksifilin, yenidoğan sıçanlarda akciğer hasarında etkileri konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Krakauer, pulmoner epitel hücre kültüründe kemokin salınımının pentoksifilin tarafından inhibe edildiğini göstermiştir (9). Hayvan deneyleri sonucunda pentoksifilin akciğer hasarı üzerine etkileri konusunda farklı sonuçlar alınmıştır. Endotoksin ile geliştirilen akut akciğer hasarında pentoksifilinden fayda görülmüştür. Hiperoksi uygulanan sıçanlarda pentoksifilin kullanımı ile fibrin birikimi azalmıştır (10, 11). Naureckas ve arkadaşları hiperoksiye maruz bırakılan yenidoğan sıçanlarda pentoksifilin etkisiz olduğunu görmüşlerdir (12). Buna karşın, tedaviye dirençli BPD'li prematüre yenidoğanlarda nebulize pentoksifilin ile belirgin cevap alındığı bildirilmiştir (13).

Makrolid antibiyotik grubu ilaçlar, antibakteryel özelliklerinden bağımsız olarak, antiinflamatuvar amaçla bronşial astım ve diffüz panbronşiolit ile seyreden hastalıklarda başarıyla kullanılmaktadır (14). Deneysel çalışmalarda klaritromisin mukus salınımını azalttığı, IL-8, IL-1, IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını baskıladığı, inflamasyon alanına nötrofil göçünü engellediği gösterilmiştir (15, 16). Lyon ve arkadaşları tarafından mekanik ventilasyon ihtiyacı gösteren preterm bebeklerde olası *U. urealyticum* enfeksiyonunu eradike etmenin, BPD gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla 0 – 7. günler arasında eritromisin tedavisi verilmiştir. Bu az sayıdaki hastada, kısa süreli tedavi sonuçlarının kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür (17).

Tüm bu bilgilerin ışığında, multifaktöryel patolojik sürecin rol oynadığı yeni BPD'de, farklı etki mekanizmaları nedeniyle kombine tedavi etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tanım

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yapılan ulusal düzeyde bir çalışma sonucunda günümüzde de geçerli olan BPD tanımı ortaya çıkmıştır (Tablo 1). (1, 2, 18)

Tablo 1. Bronkopulmoner displazi tanısal kriterlerinin tanımlanması

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

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

* Hangisi daha önce olursa

2.2 Tarihçe

Bronkopulmoner displazideki tarihsel gelişime baktığımızda; Northway ve arkadaşları 1967 yılında, ağır RDS gelişen prematüre bebeklerde, altı günü aşan sürede aralıklı pozitif basınçlı mekanik ventilasyon ve yüksek konsantrasyonda oksijen tedavisi sonrası ortaya çıkan yeni bir kronik akciğer hastalığı olarak BPD'yi tanımladı (19). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yapılan ulusal bir çalışmanın sonucunda günümüzde de geçerli olan BPD tanımı ortaya çıktı (Tablo 1) (18).

2.3 Görülme sıklığı

Değişik toplumların hastalığa duyarlılığı, tedavide uygulanan farklı protokoller ve uzun yıllar boyunca hastalığın yerleşik bir tanımlaması olmamasından dolayı, literatürde bildirilen BPD görülme sıklığı değişkenlik göstermektedir. Buna rağmen BPD erken bebeklik döneminin en sık görülen kronik akciğer hastalığıdır (20).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ulusal bilgi ağından elde edilen bilgilere göre 1995-1996 yıllarında 500-1500 g doğum ağırlığına sahip bebeklerin %3-43'ünün 36 GH'da oksijen gereksinimi olduğu bildirilmiştir (21). Hastanede yatış sırasında en az 28 gün süreyle oksijen ihtiyacı olan bebeklerde hastalığın doğum ağırlığı 500-750 g arasında olanlarda % 67; 1251-1500 g arasında olanlarda ise % 1 oranında olduğu saptanmıştır (22).

Ülkemizde BPD insidansı; Dokuz Eylül Üniversitesi'nden % 2, İnönü Üniversitesi'nden % 4.2, Ankara Üniversitesi'nden % 10.5, Uludağ Üniversitesi'nden ise % 13 olarak bildirilmiştir (23, 24, 25, 26). İnsidansların geniş bir aralıkta bildirilmesi BPD tanımı, hasta takibi ve çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere oranlarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (1).

2.4 Patofizyoloji

2.4.1 Normal akciğer gelişimi

Akciğer gelişimi mekanik ve humoral birçok faktörden etkilenir. Mevcut bilgiler ışığında insanlarda akciğer gelişimi aşağıda belirtilen beş bölüme ayrılabilir (27, 28).

1. Embriyonik dönem (Konsepsiyon sonrası 26.gün ile yedinci gestasyonel hafta arası)
Primordial önbarsaktan köken alan bir ventral divertikülüm, proksimal trakeayı oluşturmak için kaudale doğru uzanır. Bu trakea, sonrasında dallanıp her iki akciğere ana bronşlarını verir. Bu dönemde büyüme faktörleri önemli düzenleyici etkilere sahiptir.
2. Psödoglandüler dönem (7 – 16 GH arası)
Havayolunun terminal bronşioelleri oluşturmak üzere gelişimi ve solunumsal epitelyal hücrelerin oluşumu belirgindir.
3. Kanaliküler dönem (16-26 GH arası)
Solunumsal bronşioeller oluşur. Özellikle vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) etkisi ile mezenkimal damarlanma artar. Distal küboid epitelin tip I ve II epitel hücrelerine farklılaşması tamamlanır.
4. Sakküler dönem (Üçüncü trimester veya 26/28 – 32/36 GH arası)
Pulmoner parankimin boyutlarının arttığı bu dönemde sürfaktan sistemi olgunlaşır ve apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesiyle hava boşlukları arasında yer alan bağ dokusu incelir.
5. Alveolar dönem ve mikrovasküler matürasyon (32-36 GH'da başlar, büyük çoğunluğu doğumdan sonra meydana gelir)
Sakküler akciğerde mevcut olan primer septanın üzerinde sekonder krestin belirmesiyle alveoller oluşur. İmmatür alveolar septanın çift kapiller tabakasının tek tabakaya dönüşmesi sonucunda mikrovasküler matürasyon gerçekleşir. Otuzikinci GH'de doğum olması durumunda akciğerlerde olgun alveollere rastlanabilir, ancak tüm alveollerin olgunlaşması 36. GH itibariyle gerçekleşir (29).

Bronkopulmoner displazinin gelişim mekanizmalarını anlayabilmek için hayvan modelleri geliştirilmiştir. Hiperoksinin neden olduğu alveologenezis duraklamasında rol oynayan hücresel ve moleküler değişiklikler, yirmi yıldan daha fazla süredir, alveolarizasyonun postnatal 4 ile 20. günler arasında tamamlandığı kemirgenler üzerinde araştırılmaktadır (30).

2.4.2 Eski ve yeni BPD patolojisi

Yenidoğanlara mekanik ventilasyon uygulaması başlamadan önce ağır RDS geçiren bebekler ya ölmekte ya da sekelsiz iyileşmekteydiler. Mekanik ventilasyon uygulanmaya başladıktan sonra ortaya çıkan bu hastalık ilk defa Northway ve arkadaşları tarafından 1967 yılında tanımlandı. Gelişmekte olan akciğerin havayollarında ve parankiminde hem hasar hem de kısmî onarım görüldüğü için hastalığa bronkopulmoner displazi adı verildi (19).

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

Günümüzde, antenatal kortikosteroidlerin yaygın kullanımı, postnatal sürfaktan ve daha az agresif mekanik ventilasyon gibi iyileştirilmiş neonatal yoğun bakım uygulamaları sonucunda, akciğer gelişimini tamamlamamış çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere hayatta kalma oranı artmaktadır (31). Günümüzde, BPD nedeniyle ölen bebeklerde fibrozis daha az belirgin olup, havalanmanın tüm akciğer alanlarında daha eşit olarak dağılım gösterdiği bildirilmektedir. Büyük ve küçük havayollarında epitelyal metaplazi, düz kas hipertrofisi ve fibrozis daha az izlenmekte, bunların yerine septasyonda aksama ve akciğer gelişim dönemlerinden sakküler dönemde duraklama, alveolar döneme geçememeye işaret eden az sayıda, ilkel ve büyük boyutta alveoller ön plana çıkmaktadır (18).

Tablo 2. BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler (27)

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

2.4.3 Akciğer hasarının meydana geliş şekilleri

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

1. İnflamasyon

Yenidoğan akciğer hasarı modellerinde BPD patogenezinde çeşitli inflamatuvar hücrelerin ve aracılardan rol oynadığı görülmüştür (32). İnflamatuvar hücrelerden özellikle nötrofillerin önemli rol oynadığı, hiperoksik akciğer hasarı geliştirilen nötrofilden yoksun hayvanlarda hiperoksinin daha az hasar verdiği gözlenmiştir (33, 34). TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi sitokinler ve lökotrien, tromboksan ve kompleman gibi sitokin dışı proinflamatuvar maddeler BPD gelişimi ile yakından ilişkili bulunmuştur (33, 35).

2. Yapısal bozukluklar

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

3. Fibroproliferasyon

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

4. Gelişim bozulması/gecikmesi

Belirgin inflamasyon ve fibrozis bulgusu olmaksızın akciğer gelişiminde duraklama olması yeni BPD'nin başlıca özelliklerindedir (36). Fizyolojik gelişim sürecinde endojen glikokortikoidler ve retinoidler akciğer gelişimini olumlu yönde etkilerken, TGF- β 'nın inhibitör etkisi de değişimin dengede tutulmasına katkıda bulunur (2, 18).

5. Damarsal gelişim bozukluğu

Normal akciğer oluşumu için distal epitel ve kapiller ağ gelişiminin koordine ilerlemesi çok önemlidir. Birçok BPD modelinde damarsal gelişimin bozulduğu, VEGF ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (37).

DeneySEL hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, hiperoksi, hipoksi, mekanik ventilasyon ve yetersiz beslenme gibi birçok faktörün etkisinin hangi ortak son yol aracılığı ile olduğu net olarak bilinmese de, sonuçta akciğer septasyonunu azalttığı görülmüştür. TNF- α , TGF- α , IL-11 ve IL-6 gibi sitokinlerin aşırı salgılanması, fizyolojik dozlarından daha fazla glikokortikoid uygulanması, VEGF ekspresyonunun azalması ve angiogenezisin inhibisyonu gibi faktörler alveoler gelişimin bozulmasına neden olmaktadır (2, 18, 28).

2.5 Etyoloji / risk faktörleri

Bronkopulmoner displazi gelişimi karmaşık ve birçok etkene açık bir süreçtir. Bu sürece etki eden etyolojik ajanlarla ilgili ayrıntılı bilgilerin çoğuna ulaşılmasını sağlayan hayvan deneyleri sonucunda; hastalık daha ilk tanımlandığında risk faktörü olarak vurgulanmış olan prematür doğum, oksijen ve mekanik ventilasyon tedavilerinin ana risk faktörleri olduğu görülmüştür (2, 19). Bu faktörler;

1. Prematür doğum

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

2. Oksijen

Oksijen organizma için hayati bir gereksinimdir. Ancak, tıbbi nedenler ile oksijen uygulamasının akciğer üzerine hasarlı etkileri hem insan hem de havyan çalışmalarında gösterilmiştir. Yenidoğan hayvanlara sadece oksijen uygulaması sonucunda bile BPD patolojisi ile çok benzer bulgular elde edilmiştir. Verilen oksijenin düzeyi arttıkça ortaya çıkan hasarın boyutu da artmaktadır (38). Hiperoksi, hem hücre içi reaktif oksijen türevlerini arttırarak, hem de konağın hiperoksiye inflamasyon ve stres cevabına neden olarak akciğer hasarı yapmaktadır. Kemirgenlerde % 100 oksijen uygulandığında alveol-kapiller bariyerin bozulduğu, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştiği görülmüştür (40). Hiperoksinin distal havayolu dallanmasında duraklamaya apoptozu arttırarak neden olduğu öne sürülmüştür (39). Prematüre yenidoğanlarda doğumda antioksidan düzeylerinin oksijen toksisitesine engel olacak miktarda bulunmadığı bilinmektedir (38).

3. Mekanik ventilasyon

Yenidoğanlarda solunum sıkıntısı olduğunda kaçınılmaz tedavi yöntemi olan mekanik ventilasyon, aynı zamanda, yüksek basınçlar nedeniyle barotravma, akciğer hacminin artmasıyla volütravma, yetersiz sürfaktana sahip alveollerde tekrarlayan açılma ve kapanmalar yapmasıyla atelettotravma ve sonuçta artmış proinflamatuvar sitokinler nedeniyle biyotravmaya yol açarak akciğer hasarına neden olur (2, 40).

4. Enfeksiyon

Hem prenatal hem de postnatal enfeksiyonların BPD riskini arttırdığı görülmüştür (41). Düşük şiddette, asendan gelişen koryoamnionit hem erken doğuma yol açmakta hem de mekanik ventilasyon veya oksijen tedavisi almayan bebeklerde pulmoner inflamasyona neden olarak BPD riskini arttırmaktadır (32, 42).

5. Genetik

Genetik özellikler bazı bebeklerde BPD riskini arttırmakta veya BPD geliştiğinde daha ağır seyretmesine neden olmaktadır. Prematüre bebeklerin havayolu fonksiyonlarında cinsiyet ve ırksal farklılıklar tanımlanmıştır. HLA-A2 ve ailede astım öyküsü varlığı, BPD gelişimi veya şiddeti ile ilişkilidir (2, 18). Sürfaktan protein A geni ve sürfaktan protein B geni intron 4 bölgesindeki polimorfizm ile sürfaktan protein C geni dominant mutasyonlarının BPD varlığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur

(43, 44). Ek olarak, ACE geninde saptanan polimorfizmin BPD sıklığı ve şiddeti ile ilişkili olduğu görülmüştür (45).

6. Diğer etkenler

Semptomatik PDA'nın BPD gelişimine katkısı olduğu görülmüştür (41). Akciğerlerin yaşa göre beklenenden küçük olması, annenin gebelik döneminde sigara kullanması da BPD açısından risk artırıcı diğer etmenler olarak tanımlanmıştır (46).

2.6 Klinik bulgular ve prognoz

Mekanik ventilasyon öncesi dönemde, RDS'li infantlar ölmekte veya solunum sıkıntısı olmaksızın iyileşmekteydi (19). Sürfaktan ve antenatal steroid uygulaması ile BPD epidemiyolojisi, patolojisi ve kliniği belirgin olarak değişmiştir (22).

Günümüzde BPD'li infantların yaklaşık üçte ikisinin doğum ağırlığı 1,000 gramdan az ve doğum haftası 28 haftanın altındadır. Bu infantların postnatal dönemde solunum desteği almasının nedeni ağır RDS'den daha sık olarak, apne ve yetersiz solunum çabasıdır. Patent duktus arteriozus, pnömoni veya sepsis, solunum desteği süresini uzatan ve inflamasyonu arttıran faktörler olarak öne çıkmaktadır (20).

Günümüzde Northway ve arkadaşlarının tanımladığı radyolojik görünüm karışımıza nadir olarak çıkmaktadır (19). Bunun yerine, akciğer grafisinde atelettazi, havalanma artışı alanları, çizgisel interstisyel opasiteler ve kistik alanlar görülebilmektedir (47).

Hastalığın kısa ve uzun dönemde istenmeyen sonuçları mevcuttur (1, 2). (Tablo 3) Özellikle persistan BPD bulguları gösteren bebeklerde hayatın ilk birkaç yılında özellikle solunum yolu enfeksiyonlarından dolayı hastaneye yatış sıklığı artmaktadır. Nörogelişimsel süreç açısından prematüre doğum tek başına bir risk faktörü olmakla birlikte, bazı çalışmalar BPD varlığının bu sürece olumsuz katkısı olduğunu düşündürmektedir. Sürfaktan tedavisi sonrası dönemde mortalite azalmakla birlikte hastalığın kendisi ve komplikasyonları günümüzde de mortalitenin önemli sebeplerinden olmaya devam etmektedir (2, 19).

Tablo 3. BPD'nin prognozu

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

2.7 Korunma

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

2.7.1 Erken doğumun önlenmesi

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

2.7.2 Doğum öncesi tedaviler

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

2.7.3 Sürfaktan tedavisi

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

2.7.4 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

Postnatal glikokortikoid uygulaması ilk uygulandığında BPD sıklığını azaltmış olsa da uzun dönemde ortaya çıkan istenmeyen etkileri nedeniyle rutin uygulamadan kalkmıştır (49). Antienflamatuvar amaçla kromolin sodyum ve bronkodilatör olarak salbutamol tedavisi BPD gelişimini önlemede etkisiz bulunmuştur (50).

2.7.5 Patent duktus arteriozusun kapatılması

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

2.7.6 Sıvı tedavisi

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

2.7.7 Enfeksiyonların tedavisi

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

2.7.8 Mekanik ventilasyon uygulamaları

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

Yüksek frekanslı ossilatuar ventilasyon (HFOV), sürekli pozitif hava yolu basıncı (CPAP) ve permisif hiperkapni uygulamalarının BPD gelişimi sonuçlarına etkisi karşılaştırıldığında yararı olduğunu belirten yayınların yanı sıra, fark bulunmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (2, 4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar inhale nitrik oksitin faydalı olabileceği yönündedir. Ancak kolasi nörolojik yan etkileri göz önüne alınarak daha ileri çalışmalar sürmektedir (2, 4, 51).

2.7.9 Antioksidan ve beslenme tedavileri

İmmatür akciğerde reaktif oksijen türevlerinin yol açtığı hasarın BPD gelişimindeki etkisi iyi bilinmektedir (40). Buradan yola çıkarak yapılan insan çalışmalarında intratrakeal CuZn süperoksit dismutaz (SOD) ve intravenöz N-Asetilsistein tedavileri, BPD gelişimini önlemede beklenen etkiyi gerçekleştirilememiştir. Deney hayvanlarında intravenöz metalloporfirin kullanıldığında, hiperoksik hasarın kısmen geri çevrildiği görülmüştür (4).

Prematüre bebekler sınırlı kalori ve mikronutrient deposu ile doğmaktadır. Yoğun kalori desteğinin BPD gelişimini önleyemediği görülmüş, ancak çeşitli mikronutrient tedavilerinden olumlu sonuçlar alınmıştır. Akciğerin normal gelişiminde de rol oynayan retinoik asit, hayvan çalışmalarında hiperoksik akciğer hasarını azaltıcı etkide bulunmuştur (52). İntramusküler Vitamin A uygulamasının BPD gelişimini engellediği yönünde çalışmalar mevcut olmakla birlikte, bu tedavi şekli henüz tüm dünyada rutin kullanıma girmemiştir (4).

2.7.10 Umut verici yaklaşımlar

Henüz birkaç çalışma ile yararlı olduğu gösterilen ancak çok merkezli klinik çalışmalar ile desteklenmesi gereken yaklaşımlar arasında inositol desteği, proteinaz inhibitörleri, antisitokin tedavileri, Rh superoksit dismutaz ve gen tedavisi sayılabilir (2, 4, 53).

2.8 Tedavi

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

2.8.1 Oksijen/Vazodilatörler

Oksijen tedavisi, hipoksik infantlarda solunumsal belirtileri geriletir ve büyümeyi destekler. Ağır BPD olgularında kliniğin bir parçası olan pulmoner hipertansiyonda, oksijenin vazodilatör etkisi ile pulmoner arter basınçları geriler. Ancak en uygun oksijen saturasyonu veya PO₂ konusunda görüş birliği yoktur. Nifedipin ve inhale nitrik oksit gibi vazodilatör ajanlar pulmoner damar direncini azaltarak oksijenizasyona katkıda bulunurlar (2, 48).

2.8.2 Diüretikler

İnterstisyel alveolar ödemin giderilmesi amacıyla diüretikler uzun süre kullanılmıştır. Ancak faydasının akut ve sınırlı olması, metabolik yan etkilerinin varlığı ve uzun süreli kullanım sonuçları konusunda yeterli bilgi olmaması nedeniyle sistemik veya aerosol şeklinde furosemidin BPD tedavisinde rutin kullanımı önerilmemektedir (48, 54).

2.8.3 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

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

Sistemik metilksantinler (teofilin ve kafein) bronkodilatasyon, solunumun uyarılması, hafif diüretik etki ve antienflamatuvar etkilere sahiptirler. Ancak uzun dönem nörolojik etkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır (2, 55).

2.8.4 Mukolitikler

Randomize çalışmaları olmamakla birlikte intratrakeal veya nebulize dornase – α kullanımı BPD’de görülen mukus tıkaçlarını geriletmede başarılı görünmektedir (2).

2.8.5 Beslenme

Beslenmenin ve özellikle protein alımının yetersiz olması prematür akciğerin hasara yatkınlığını arttırmaktadır. Buradan hareketle beslenme dikkatle düzenlenmelidir ancak BPD’li infantlara özel bileşim ve süreye sahip bir diyet tanımlanmamıştır (2, 18).

2.8.6 Glikokortikoidler

Kısa ve uzun dönemde gelişen çeşitli metabolik, nörolojik ve gastrointestinal komplikasyonlar nedeniyle glikokortikoidler tedavide rutin kullanımdan çıkmıştır (2, 56).

2.8.7 İkincil hastalıkların önlenmesi

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

2.8.8 Umut verici tedaviler

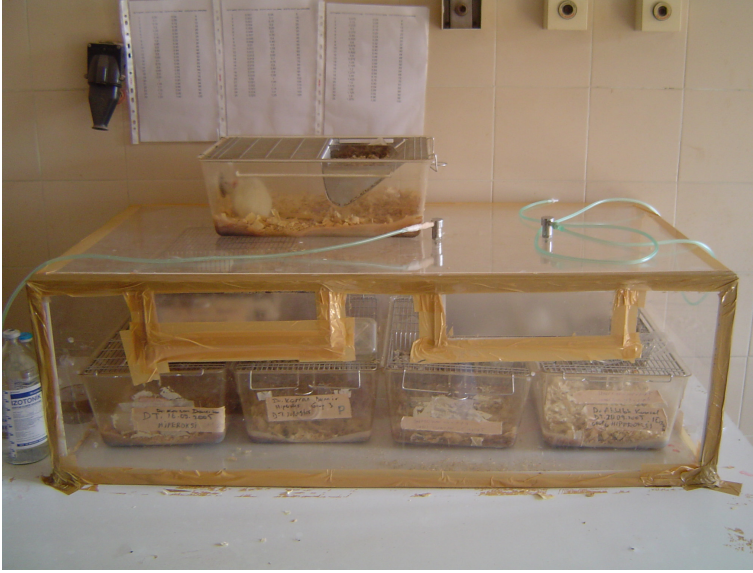
Var olan tedavilerinin geliştirilmesi ve yenilerinin araştırılması hem hayvan hem de insan çalışmaları ile sürmektedir (2, 48, 51). Neonatal hiperokside rekombinan insan VEGF tedavisinin normal akciğer yapısının kazanılmasını sağladığı görülmüştür (57). Akciğer parankiminde bulunan Endotelin 1 reseptörlerinin tezosentan ile bloke edilmesi sonucunda hiperoksik akciğer hasarı önlenmiştir (58). Bir peroksizom proliferatör aktivatör reseptör agonisti olan rosiglitazon, deneysel hiperoksik akciğer hasarı tedavisinde olumlu etkide bulunmuştur (59). Deneysel BPD’de kök hücre tedavisinin yeri henüz tartışmalıdır (60).

3. YÖNTEM

3.1 Hayvan modeli ve tedaviler

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alınan bu çalışma, aynı üniversitenin Deneysel Hayvan Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Gebeliği planlanmış Wistar suşu sıçanların kendiliğinden doğan yavru sıçanları, altı gruba ayrılıp, her bir grup ayrı kafeste bulunduruldu. Spontan doğumu takiben yavru sıçanlar anneleri ile tutuldu. Postnatal 3. günde başlayıp 13. güne kadar devam eden deneyde toplam 47 yavru yenidoğan sıçan yer aldı (52). Sıçanlar altı gruba ayrıldı. Grup 1’de bulunan sıçanlar (n=9) kontrol grubu olarak oksijene maruz bırakılmayıp oda havasında tutuldu. Grup 2, 3, 4, 5 ve 6, pleksiglastan imal edilen kapalı alanda (Şekil 1) tutulup deney süresince hiperoksiye (90 ± 2) maruz bırakıldı. Oksijen konsantrasyonu günde üç defa kontrol edildi (Anesthetic Gas Monitor, Type 1304, Brüel&Kjær, Denmark). Nem oranı %80’in üzerinde tutuldu ve CO₂ soda-lime ile uzaklaştırıldı. Oda havasında tutulan sıçanlar ile hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlar deney süresince aynı odada bulunduruldu. Sıçanlar postnatal 14. günde intraperitoneal pentobarbital sodium (200 mg/kg) enjeksiyonu ile öldürüldü.

Şekil 1. Deney düzeneği. Pleksiglastan imal edilen kapalı alan üstünde oda havasına, içinde ise hiperoksiye maruz bırakılan deney hayvanları görülmektedir.



3.1.1 Çalışma grupları

Grup 1 (n=9): Oda havasında kalan, oksijene maruz bırakılmayan ve salin ile tedavi edilen kontrol grubu

Grup 2 (n=8): Hiperoksi uygulanarak klaritromisin verilen grup

Grup 3 (n=10): Hiperoksi uygulanarak montelukast verilen grup

Grup 4 (n=8): Hiperoksi uygulanarak pentoksifilin verilen grup

Grup 5 (n=6): Hiperoksi uygulanarak klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin verilen grup

Grup 6 (n=6): Hiperoksi uygulanarak salin verilen grup

3.1.2 İlaçların uygulanması

Her ilaç için uygun intraperitoneal ve subkutan dozlar, daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlenmiştir. İlaçlar 3-13. günler arasında uygulanmıştır. Plasebo olarak, intraperitoneal yolla bir dozda % 0.9'luk salin 0.2 cc/gün uygulanmıştır.

Tablo 4. Deneide kullanılan ilaçların kullanım özellikleri.

| İlaç | Veriliş yolu | Uygulanımı | Kaynak |
|---------------|---------------------|--------------------------|---------------|
| Klaritromisin | Subkutan | 100 mg/kg/gün, iki dozda | 61 |
| Montelukast | Subkutan | 1 mg/kg/g, bir dozda | 7 |
| Pentoksifilin | İntraperitoneal | 150 mg/kg/gün, iki dozda | 11 |

3.2 Doku hazırlığı

Postnatal 14. günde torakotomi ile çıkarılan akciğerler fikse edilip bir gece %10'luk formalin içinde bırakıldı. Fikse edilmiş akciğer dokusunun her bir lobu ayrı ayrı kasetlere konup doku işleminin ardından parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mm kalınlığında kesitler alındı ve tek bir patolog tarafından (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu) kör bir şekilde değerlendirildi.

3.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi

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

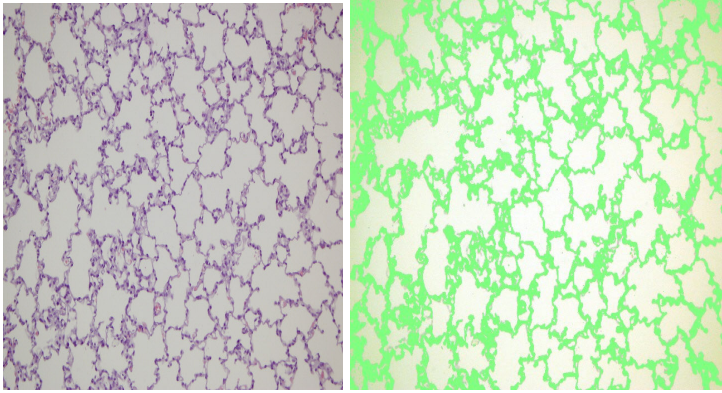
3.4 Alveolar alanın morfometrik ölçümü

Alveoler alan, bilgisayarlı dijital histokimyasal görüntü analizi yöntemi ile akciğer parenkiminin yüzdesi olarak ölçüldü. Dijital görüntüler hematoksilin eozin boyalı kesitlerden, 40'lık büyütmede, ışık mikroskobuna (Olympus BX51, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) bağlı 3CCD renkli video kamera (Olympus DP70, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) ile elde edildi. Görüntüler daha önce tarif edilen yöntemler modifiye edilerek Mediscope Görüntü Analiz Programı (Mediscope, Dokuz Eylül Üniversitesi, Klinik Mühendislik Birimi, İzmir, Türkiye) kullanılarak işlem gördü (62, 63, 64, 65). Her sıçanda, 10 adet büyük büyütme görüntüsü seçildi ve dijital hale getirildi. Görüntülerin büyük arteryel, bronşiyeler veya bronşiyel yapılar içermesi durumunda, Paintbrush programı (Microsoft) kullanılarak ölçüm dışı bırakıldı (Şekil 2-3).

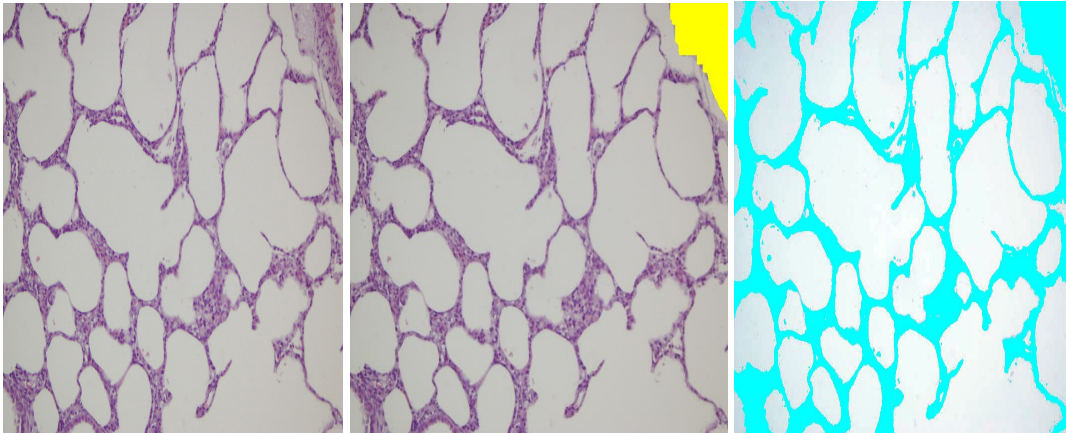
Elde edilen her alan için, alveolar alanı gösteren beyaz alanların yüzdesi yarı otomatik olarak belirlendi. Görüntüdeki beyaz alanlar patolog tarafından belirlenip işaretlendi.

Ardından sistem, aynı boyamaya sahip alanları seçip piksel birimlerine dönüştürdü ve her alan için seçilen beyaz alanların yüzde olarak oranını verdi. Patolog, en uygun seçime ulaşana dek işlemi tekrarladı. On kesit alanının ortalama değerleri belirlenip alveolar alan (AA) olarak adlandırıldı.

Şekil 2. Alveolar yüzey alanının değerlendirilmesi. Grup 4'deki bir sıçanın akciğer kesitinin: (2A) normal görünümü ve (2B) görüntü analizi kullanılarak alveolar alanın seçimi (alveolar alan=% 67.7)



Şekil 3: Alveolar yüzey alanının Paintbrush programı kullanılarak değerlendirilmesi. Grup 5'deki bir sıçanın akciğer kesitinin (3A) normal görüntüsü, (3B) Paintbrush programında arterin silindiği görünüm, (3C) görüntü analizi yöntemiyle alveolar alanının seçimi (Alveolar alan, düzeltme öncesinde tüm alanın %76.2'si bulunmuş iken arteriyel alanın çıkartılmasından sonra yüzde %72.7 olarak ölçülmüştür)



3.5 Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi

Düz kas aktin (SMA) ekspresyonu avidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılarak görünür hale getirildi. Sağ kaudal ve sol lobların gömülü dokularından poly-L-lysin kaplı camlar üzerine kesit alındı. Bu kesitler ksilen ile deparafinize edildi, distile suya batırılıp rehidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, hidrojen peroksidazın (phosphate-buffered saline) PBS içindeki %0,3'lük çözeltisi kullanılarak engellendi. Düz kas aktinine yönelik primer antikor (önceden sulandırılmış, LABVISION Corp, ABD) oda sıcaklığında 30 dakika süresince uygulandı ve PBS içinde yıkandı. Sekonder antikor streptavidin-peroksidaz kompleksi (Neomarkers, Fremont, CA), sırasıyla, 10 dakika oda sıcaklığında uygulanıp PBS'te yıkandı. Peroksidaz aktivitesi 5 dakika uygulanan %0.03 derişimde 3–3 diaminobenzidin tetrahidroklorid (Sigma Chemical Co.) ile görüntüledi Deionize suda yıkayıp hematoksilin ile boyanan kesitler dehidrate edilip kapatıldı. Uygun doku kesitleri primer ve sekonder antikor için ayrıca pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlemde geçirildi. İmmünohistokimyasal skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen on alan rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 1'den 4'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi.

3.6 Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler

İstatistik değerlendirme için SPSS 11.5 (Chicago, IL) programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığı yansıtan değer olarak p değeri <0.05 olarak seçildi. Deney grupları sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılarak hesaplandı. Ortalama alveol alanları değerleri one-way ANOVA (Bonferonni'nin çoklu karşılaştırmalar için düzeltmesi kullanılarak) ile karşılaştırıldı. İmmünohistokimyasal skorların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Mann Whitney-U testleri kullanıldı. Gruplar arasında fibrozis skorlarının oranları Kolmogorov-Smirnov analizi kullanılarak karşılaştırıldı.

Ek olarak, seçilen bölgelerin önemini test etmek amacıyla, rastgele seçilen üç sıçanın sonuçları, rastgele seçilen 10 alanın sonuçlarının ortalaması ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. Paired t-test sonucunda yine anlamlı fark saptanmadı.

4. SONUÇLAR

4.1 Kilo alımı

Gruplar arasında, sıçanların ortalama doğum ağırlıkları açısından farklılık yoktu ($p>0.05$). Deney sonunda ise, hiperoksiye maruz bırakılan sıçanların ağırlıkları oda havasında tutulanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşüktü ($p=0.001$).

Tablo 5. Gruplara göre deney sonunda sıçan ağırlıklarının grup ortalamaları

| | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 | Grup 4 | Grup 5 | Grup 6 |
|-----------------------------------|----------------|---------------|--------------|---------------|----------------|----------------|
| Ağırlık (g), ortalama \pm SD | 19.3 \pm 1.4 | 9.3 \pm 0.7 | 13 \pm 0.6 | 9.2 \pm 3.2 | 10.1 \pm 1.1 | 11.6 \pm 2.2 |

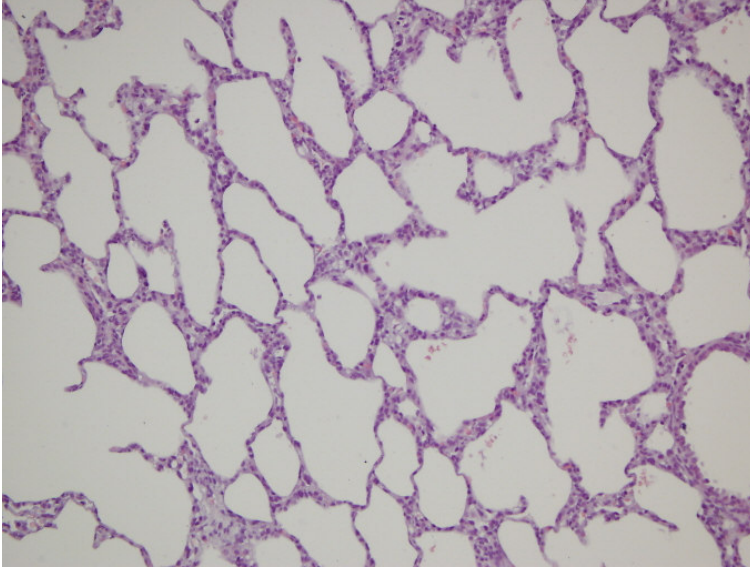
4.2 Alveoler yüzey alanı ölçümü

Her grubun ortalama alveol yüzey alanı değerleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 6). Grup 6'da yer alan sıçanlarda ortalama alveol alanları, grup 1'de bulunan sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur ($p=0.001$). Klaritromisin tedavisi alan sıçanların alveol alanları, plasebo grubundakilerin alveol alanlarından üstün bulunmamıştır ($p=1.0$). Montelukast tedavisi, plasebo tedaviye göre daha düşük ortalama akciğer alanı değerleri ile sonuçlansa da istatistiksel anlamlılık oluşmamıştır ($p=0.079$). Pentoksifilin tedavisi, plasebo tedaviye göre daha yüksek ortalama akciğer alanı değerleri ile sonuçlansa da istatistiksel anlamlılık oluşmamıştır ($p=0.065$). Kombine tedavi ise plasebo tedavi alan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek ve oda havasında tutulan sıçanlar ile istatistiksel olarak benzer ortalama akciğer alanı değerleri ile sonuçlanmıştır (sırasıyla, $p=0.002$ ve $p=1.0$) (Şekil 4).

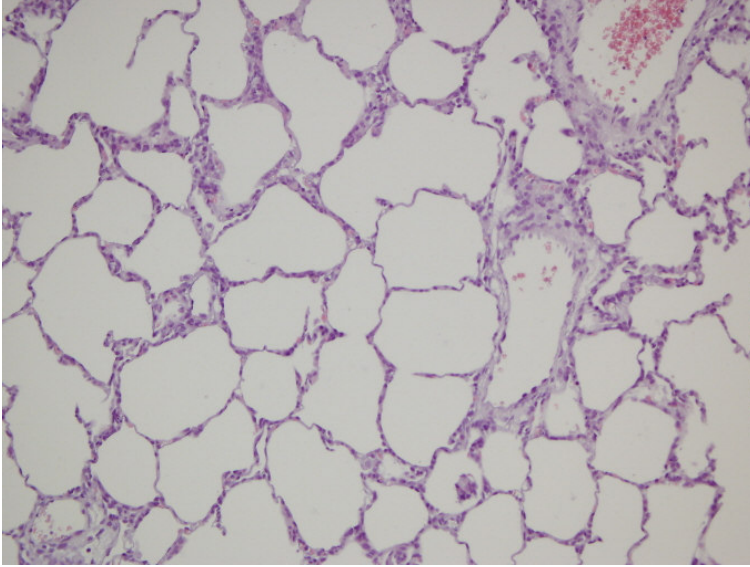
Tablo 6. Gruplara göre ortalama alveol alanı değerleri

| Grup | Ort. alveol alanı (μm^2) |
|---|---|
| 1. Plasebo +Oda havası | 65.3 \pm 2.7 |
| 2. Klaritromisin + O ₂ | 50.9 \pm 4.2 |
| 3. Montelukast + O ₂ | 41.6 \pm 4.8 |
| 4. Pentoksifilin + O ₂ | 59.4 \pm 6.8 |
| 5. Klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin + O ₂ | 64 \pm 3 |
| 6. Plasebo + O ₂ | 50.2 \pm 10.4 |
| Grup karşılaştırmaları | <i>p</i> |
| 1 – 2 | 0.001 |
| 1 – 3 | 0.001 |
| 1 – 4 | 0.559 |
| 1 – 5 | 1.0 |
| 1 – 6 | 0.001 |
| 2 – 3 | 0.019 |
| 2 – 4 | 0.066 |
| 2 – 5 | 0.002 |
| 2 – 6 | 1.0 |
| 3 – 4 | 0.001 |
| 3 – 5 | 0.001 |
| 3 – 6 | 0.079 |
| 4 – 5 | 1.0 |
| 4 – 6 | 0.065 |
| 5 – 6 | 0.002 |

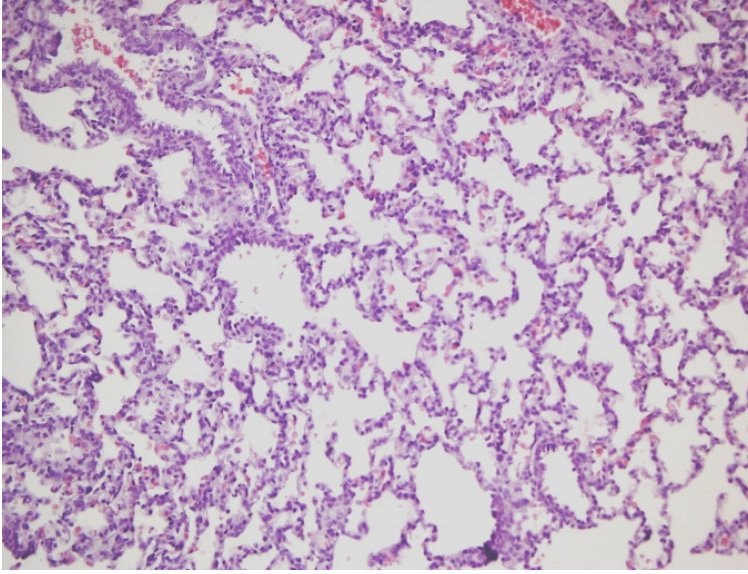
Şekil 4. Çalışma gruplarında alveol yüzey alanının değerlendirildiği akciğer kesitleri. (4A) Oda havası grubu, (4B) Kombine ilaç grubu, (4C) Hiperoksi+Plasebo grubu.
(4A)



(4B)



(4C)



4.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi ve immünohistokimyasal SMA boyaması

Tüm grupların fibrozis skorları tabloda belirtilmiştir (Tablo 7). Fibrozis, hiperoksiye maruz kalıp plasebo tedavi alan sıçanlarda oda havasında kalanlara göre anlamlı olarak fazla bulundu ($p=0.007$). Fibrozis, oda havası grubundaki sıçanların sadece birinde ve hafif derecede saptanırken, hiperoksi+plasebo grubundaki sıçanlarının hepsinde saptandı. Fibrozis, hiperoksi+klaritromisin ve hiperoksi+montelukast gruplarındaki sıçanların hepsinde gözlendi ve sonuçlarının hiperoksi+plasebo grubunun fibrozis skorlarından farklı olmadığı görüldü (sırasıyla, $p=0.841$, $p=0.987$). Fibrozis, hiperoksi+pentoksifilin grubundaki sıçanların %25'inde saptanmadı, geri kalanında ise hafif veya orta şiddette idi. Fibrozis, hiperoksi+kombine tedavi uygulanan sıçanların üçte ikisinde saptanmazken, geri kalanında hafif şiddette idi. Bu sonuçlar, oda havası grubundaki sıçanların değerlerinden farklı bulunmazken, hiperoksi+plasebo grubuna olan üstünlük istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla, $p= 0.994$, $p=0.139$).

Tablo 7. Deney gruplarında fibrozis skorlarına göre dağılım

| Grup | Fibrozis | | | |
|---|-----------------|-------|------|------|
| | Yok | Hafif | Orta | Ağır |
| 1. Plasebo +Oda havası (n=9) | 8 | 1 | 0 | 0 |
| 2. Klaritromisin + O ₂ (n=8) | 0 | 1 | 3 | 4 |
| 3. Montelukast + O ₂ (n=10) | 0 | 1 | 6 | 3 |
| 4. Pentoksifilin + O ₂ (n=8) | 2 | 2 | 4 | 0 |
| 5. Klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin + O ₂ (n=6) | 4 | 2 | 0 | 0 |
| 6. Plasebo + O ₂ (n=6) | 0 | 2 | 3 | 1 |
| Grup karşılaştırmaları | <i>p</i> | | | |
| 1 – 2 | 0.002 | | | |
| 1 – 3 | 0.001 | | | |
| 1 – 4 | 0.063 | | | |
| 1 – 5 | 0.994 | | | |
| 1 – 6 | 0.007 | | | |
| 2 – 3 | 0.994 | | | |
| 2 – 4 | 0.270 | | | |
| 2 – 5 | 0.010 | | | |
| 2 – 6 | 0.841 | | | |
| 3 – 4 | 0.476 | | | |
| 3 – 5 | 0.071 | | | |
| 3 – 6 | 0.987 | | | |
| 4 – 5 | 0.358 | | | |
| 4 – 6 | 0.983 | | | |
| 5 – 6 | 0.139 | | | |

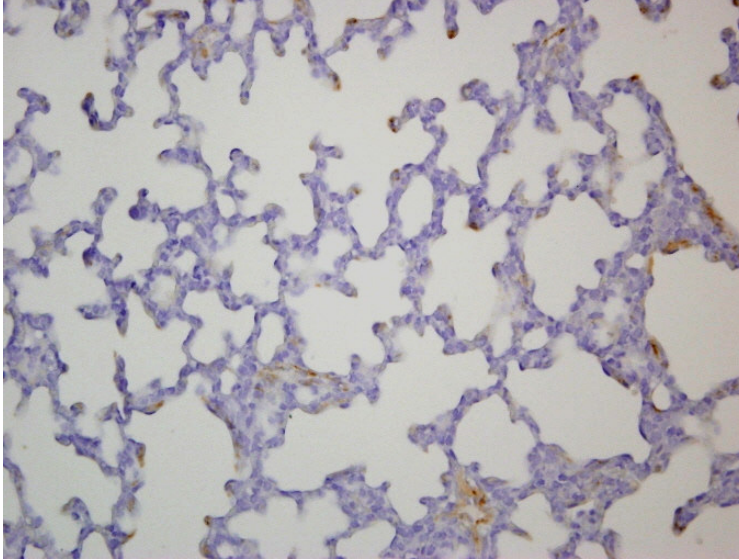
Düz kas antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, hiperoksiye maruz kalan grupta akciğerlerde artmış düz kas içeriği olduğu görüldü. Tablo 8'de aktin skorlarının gruplara göre dağılımı sunulmaktadır. Hiperoksi+plasebo grubunda ortalama aktin skorlarının, oda havasına maruz kalan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü ($p=0.045$) (Şekil 5). Hiperoksi+klaritromisin ve hiperoksi+montelukast tedavilerinin düz kas içeriği açısından, hiperoksi+plaseboya üstün olmadığı görüldü (sırasıyla $p=0.508$, $p=0.868$). Hiperoksi+pentoksifilin tedavisi, hiperoksi+plasebo grubuna göre daha düşük aktin skoru ile sonuçlansa da istatistiksel anlamlılık oluşmadı ($p=0.066$). Hiperoksi+kombine tedavi, hiperoksi+plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha düşük ortalama aktin skoru değerleri ile sonuçlandı ($p=0.005$).

Tablo 8. Gruplara göre aktin skorları

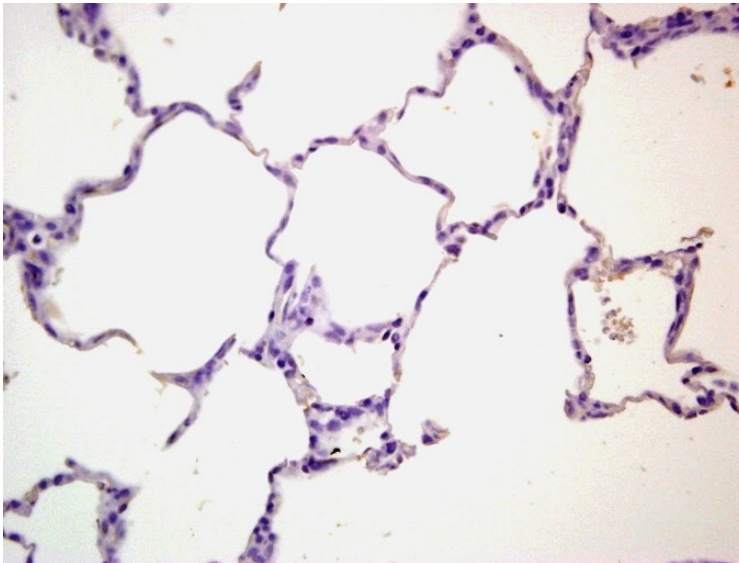
| Grup | Aktin skoru, Ortanca [Minimum – Maksimum] |
|---|--|
| 1. Plasebo + Oda havası | 2 [1-4] |
| 2. Klaritromisin + O ₂ | 7.5 [2-9] |
| 3. Montelukast + O ₂ | 5 [2-9] |
| 4. Pentoksifilin + O ₂ | 1.5 [0-6] |
| 5. Klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin + O ₂ | 0 [0-1] |
| 6. Plasebo + O ₂ | 6 [0-12] |
| Grup karşılaştırmaları | <i>p</i> |
| 1 – 2 | 0.003 |
| 1 – 3 | 0.002 |
| 1 – 4 | 0.804 |
| 1 – 5 | 0.005 |
| 1 – 6 | 0.045 |
| 2 – 3 | 0.486 |
| 2 – 4 | 0.008 |
| 2 – 5 | 0.001 |
| 2 – 6 | 0.508 |
| 3 – 4 | 0.01 |
| 3 – 5 | 0.001 |
| 3 – 6 | 0.868 |
| 4 – 5 | 0.057 |
| 4 – 6 | 0.066 |
| 5 – 6 | 0.005 |

Şekil 5. Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirmesi. (5A) Oda havası grubu, (5B) kombine ilaç grubu ve (5C) hiperoksi+plasebo grubunda akciğer kesitlerinin görünümü.

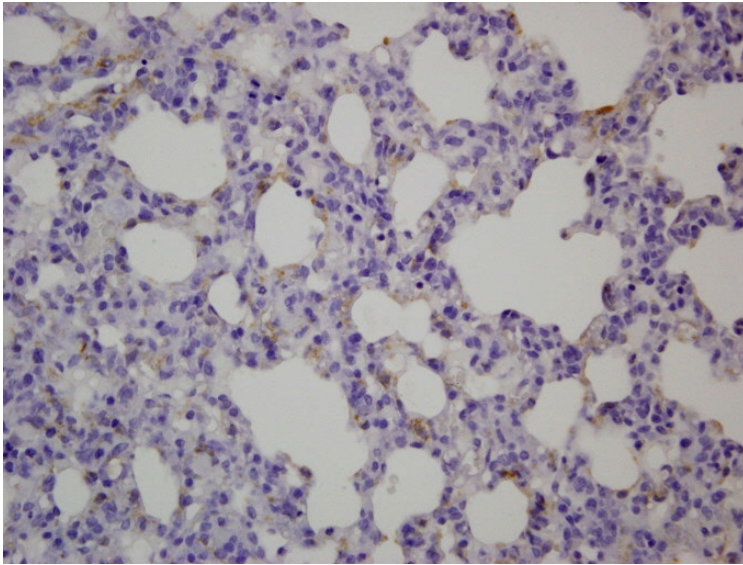
(5A)



(5B)



(5C)



5. TARTISMA

Günümüzde, iyileştirilmiş neonatal yoğun bakım uygulamaları sonucunda, akciğer gelişimini tamamlamamış, çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere hayatta kalma oranı artmaktadır (31). Buna paralel olarak, BPD patolojisinde ilk tanımlandığı dönemden bu yana önemli değişiklikler meydana gelmiş olup, günümüzde “yeni BPD” olarak tanımlanan patolojik bulgular ile karşılaşmaktadır (Tablo 2) (27). Henüz, özellikle yeni BPD için etkinliği kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamakta ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmada, gelişim evresi insanlardaki geç sakküler ve erken alveolar dönem ile uyumlu olan immatür akciğerlere sahip yenidoğan sıçanlarda BPD gelişiminde önemli risk faktörlerinden biri olan hiperoksik akciğer hasarı oluşturularak, klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin tedavilerinin alveolar alan, fibrozis ve düz kas hiperplazisi/oluşumu üzerine olan etkinliği tek başına ve kombine olarak histolojik düzeyde araştırıldı.

Hiperoksik akciğer hasarı mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, tedaviye yön verebilecek geniş bir bilgi birikimi ortaya çıkmıştır. Hiperoksiye cevap olarak hücre içi reaktif oksijen türevlerinin arttığı, proteinaz/antiproteinaz dengesinin bozulduğu, inflamasyon ve stres cevabını ortaya çıktığı, hücre büyüme ve farklılaşma düzeninin bozulduğu görülmüştür (40). Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile uyumlu olarak akciğer endotel ve epitel hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir (66). Hiperoksi distal havayollarında dallanmayı baskılayarak, gelişimin duraklamasına neden olmaktadır (67). Hiperoksi maruziyetinin özellikle nötrofillerin aktivasyonuna yol açtığı ve bu yolla endotel ve epitel hücre hasarına neden olduğu (68), TGF- α (69) ve lökotrien düzeylerini arttırdığı (70), hücre çekirdeğinde inflamasyon, koagülasyon, fibrinoliz ve hücre siklusu genleri üzerinde etkili olduğu (71), endotelin-1 düzeylerinin arttırdığı (58) yakın dönemde gösterilmiş mekanizmalar arasında yer almaktadır.

Son zamanlarda, makrolid grubu antibiyotiklerin, antibakteriyel özelliklerinden bağımsız olarak antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu görülmüştür (14). Deneysel çalışmalarda klaritromisinin mukus salınımını azalttığı, IL-8, IL-1, IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar ajanların yapımını baskıladığı, VEGF ve VEGF mRNA üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (15, 16, 72). Bunun yanında, klaritromisinin, inflamatuvar hücrelerden nötrofillerin inflamasyon alanına göçünü engellediği, in vitro ortamda aktive olmuş lenfositlerin apoptozunu arttırdığı görülmüştür (73, 74).

Çalışmamızda hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlara daha önce bu konudaki etkileri araştırılmamış olan klaritromisin tedavisi uygulandığında, ortalama alveol alanı plasebo grubundan farklı değildi. Hiperoksiye maruz kalan sıçanlar içinde fibrozis en şiddetli olarak klaritromisin grubunda görüldü. Bununla paralel olarak en yüksek aktin skoru da tek başına klaritromisin tedavisi alan sıçanlarda saptandı. Hiperoksik akciğer hasarında klaritromisinden beklediğimiz faydayı göremememizin sebebi, kullanım süresinin kısa olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü, klaritromisin ve diğer makrolid grubu ilaçların antiinflamatuvar etkilerinin ortaya çıkmasının haftalar sürebileceği, bu amaçla uzun süreli kullanımları gerektiği belirtilmiştir (75).

Lökotrienler, inflamasyonda rol alan önemli mediatörlerdendir. Yenidoğan sıçanlarda hiperoksiye cevap olarak LTB4 düzeylerinin arttığı (6), lipooksijenaz enzimi inihbisyonu ile oksijen hasarının zararlı etkilerinin geri döndüğü (76) gösterilmiştir. Artmış lökotrienlerin düz kas kalınlığında ve havayolu hiperreaktivitesinde de artışa neden olduğu bilinmektedir (77). Lökotrien reseptör antagonistlerinin inflamatuvar hücrelerden T lenfositlerin apoptozunu indüklediği saptanmıştır (78). Hiperoksinin neden olduğu akciğer hasarında montelukast tedavisinin yeri daha önce Jouvencel ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (7). Yeni BPD'nin patolojik bulgularından sadece alveolarizasyon derecesinin değerlendirildiği bu çalışmada montelukast tedavisinden fayda görülmemiştir (7).

Bu çalışmada hiperoksinin neden olduğu inflamasyonda lökotrien yolağının baskılanması amacıyla, hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlara tek başına montelukast tedavisi uygulandığında, ortalama alveol alanı plasebo tedaviden de daha düşük olarak sonuçlandı. Montelukast grubundaki tüm sıçanlarda fibrozis saptandı. Fibrozis derecesi plasebo veya klaritromisin tedavilerinde elde edilen sonuçlardan farklı bulunmadı. Bununla paralel olarak aktin skoru da yüksek bulundu ve düz kas artışında koruyucu bir etki görülmedi. Biz, bu çalışmada, Jouvencel ve arkadaşlarının çalışmasından (7) farklı olarak montelukast tedavisini hiperoksi ile eş zamanlı olarak uyguladıysak da, alveolarizasyonun baskılanmasını engelleyemediğini gördük. Yine aynı çalışmanın verilerinden farklı olarak hiperoksinin neden olduğu fibrozis ve SMA ekspresyonunu değerlendirdiğimizde tek başına montelukast tedavisinin olumlu bir etkisi olmadığını gördük. Bu sonuçlar, hiperoksik akciğer hasarı tedavisinde, sadece, araşidonik asit yolağının son kısmında yer alan lökotrien B4'ün antagonize edilmesinin oksidatif zararın geri döndürülmesinde yeterli olmadığını göstermektedir.

Pentoksifilin, bir ksantin türevi olup fosfodiesteraz inhibitörüdür. İnflamatuvar süreçten sorumlu birçok mediyatörün düzeyini (IL-1, IL-10 ve TNF- α) azaltır, nötrofil fonksiyonları üzerine baskılayıcı etkileri vardır (8). Pentoksifilin yenidoğan sıçanlarda akciğer hasarında etkileri konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İnflamatuvar hücreleri baskılamasının yanısıra, pulmoner epitel hücrelerinden kemokin salınımının da pentoksifilin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (9). Hayvan deneyleri sonucunda pentoksifilin akciğer hasarı üzerine etkileri konusunda farklı sonuçlar alınmıştır. Sıçanlarda endotoksin ile geliştirilen akut akciğer hasarında pentoksifilinden fayda görülmüştür (10). İlk olarak 1994'te Naureckas ve arkadaşları hiperoksik akciğer hasarı modelinde pentoksifilin etkilerini araştırmışlardır. Erişkin sıçanlara 40 mg/kg/g dozunda pentoksifilin uyguladıklarında mortalitenin azalmadığını belirtmişlerdir. Bronkopulmoner displazinin patolojik özelliklerini ise değerlendirmemişlerdir (11). Gavino ve arkadaşları 2002'de pentoksifilin hiperoksi uygulanan sıçanlarda pnömositlerin apoptozunu engellediği göstermiştir (79). ter Horst ve arkadaşları 2004'te yaptıkları çalışmanın sonucunda, hiperoksi uygulanan yenidoğan sıçanlarda, 150 mg/kg/g dozunda pentoksifilin kullanımı ile kontrol gruba göre sağkalımın arttığını, fibrin birikiminin ise belirgin derecede azaldığını bildirmişlerdir (12). Bununla birlikte, nebülize pentoksifilin tedavisinin klinik uygulamaları sonucunda, çeşitli tedavilere dirençli BPD'li yenidoğanların oksijen bağımlılığında kurtulduğu, postnatal 3. gün itibariyle %30 ve üzeri oksijen ihtiyacı ile solunum desteğine gereksinimi olan çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere ise birinci ay sonunda oksijen desteği ihtiyacında belirgin azalma olduğu görülmüştür (13, 80).

Bu çalışmada hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlarda tek başına pentoksifilin tedavisi uygulandığında, ortalama alveol alanı değerleri ve SMA ekspresyonu sonuçları plasebodan daha iyi olmakla birlikte, istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p=0.065$ ve $p=0.066$). Fibrozis, pentoksifilin grubundaki sıçanların %25'inde hiç gözlenmedi, geri kalan sıçanlarda ise hafif veya orta şiddette saptandı ancak istatistiksel olarak plasebo tedaviden farklı bulunmadı. Pentoksifilin tedavisi ile, klaritromisin veya montelukast alan sıçanlara göre daha az şiddette fibrozis ve SMA ekspresyonu saptanmakta birlikte bu sonuç sadece SMA ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlılık kazandı (sırasıyla, fibrozis: $p=0.270$, $p=0.476$, SMA ekspresyonu: $p=0.008$, $p=0.01$). Tek başına pentoksifilin tedavisi uygulandığında, faydalı etkilerinin plaseboya göre istatistiksel olarak farklılık yaratmamış olması, (1) TNF- α 'nın hiperoksik hasarda merkezi rol oynamaması, (2) düzeyi arttırıldıkça faydası belirginleşen

pentoksifilin daha yüksek dozlarda uygulanması gereksiniminden kaynaklanıyor olabilir (11, 81).

Bronkopulmoner displazi modeli olarak kullanılan hiperoksik akciğer hasarında farklı mekanizmalar rol almaktadır. Klinik olarak, BPD olgularında, ana mekanizmaların her birinin değişen oranlarda patogeneze katkısı bulunmaktadır (2). Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlarda, farklı patofizyolojik süreçlerde rolü olan klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin kombine edilerek uygulandığında, ortalama alveol alanı değerleri, oda havasına maruz bırakılan sıçanlara çok yakın ve hiperoksiye maruz kalıp plasebo veya tek ilaç uygulanan sıçanlardan ise istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptandı. Fibrozis, kombine tedavi grubunun üçte birinde ve sadece hafif şiddette görüldü. Fibrozis derecesi tek başına klaritromisin verilenlere göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu, ancak tek başına montelukast, pentoksifilin veya plasebo tedavi alanlara göre daha düşük olsa da bu sonuç istatistiksel olarak anlamlılık kazanmadı (sırasıyla, $p=0.010$, $p=0.071$, $p=0.358$, $p=0.139$). Bununla birlikte, kombine tedavinin düz kas artışında montelukast, klaritromisin ve plaseboya göre daha üstün koruyucu etkisi olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.005$).

Sonuç olarak, klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin kombine ilaç tedavisinin, yenidoğan sıçanlarda gerçekleştirdiğimiz hiperoksik akciğer hasar modelinde plasebo tedaviye göre üstün olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, karmaşık patofizyolojik süreçlere sahip ve yerleşik etkili tedavi stratejilerinin bulunmadığı yeni BPD’de, kombine ilaç kullanımının başarılı olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR

1. Hiperoksik akciğer hasarında kilo alımının geri kaldığı, akciğerlerde alveol yüzey alanının azaldığı, fibrotik değişikliklerin meydana geldiği ve düz kas içeriğinin arttığı görüldü.
2. İlaç tedavilerinin, tek başlarına kullanıldıklarında alveolar yüzey alanı, fibrozis ve düz kas içeriği kriterlerine göre plasebo tedaviden üstün olmadığı saptandı.
3. Kullanılan üç ilaç içinde, tek başına kullanıldığında en iyi sonuçlar, pentoksifilin ile elde edildi. Ortalama alveol yüzey alanı kombine tedavi grubundakine yakın bulundu. Pentoksifilin tedavisi sonucunda ağır fibrotik değişiklik saptanmadı. Aktin skoru kombine tedaviye en yakın olan grup pentoksifilin grubu idi. Ancak, bu değerler plasebo grubuna göre istatistiksel olarak farklı değildi.
4. Klaritromisin, montelukast ve pentoksifilin kombine ilaç tedavisi, hiperoksik akciğer hasarında alveol yüzey alanı ve düz kas içeriği açısından plasebo tedaviye göre üstün bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006;367:1421-1431.
2. D'Angio CT, Maniscalco WM. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Paediatr Drugs* 2004; 6(5): 303-330.
3. Sweet DG, Halliday HL. A risk-benefit assessment of drugs used for neonatal chronic lung disease. *Drug Saf* 2000; 22(5): 389-404.
4. Van Marter LJ. Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17:174-180.
5. Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet* 1999; 353: 57–62.
6. Hosford GE, Koyanagi KS, Leung WI, Olson DM. Hyperoxia increases protein mass of 5-Lipoxygenase and its activating protein, FLAP, and leukotriene B4 output in newborn rat lungs. *Exp Lung Res* 2002; 28:671-684.
7. Jouvencel P, Fayon M, Choukroun ML, Carles D, Montaudon D, Dumas E, Begueret H, Marthan R. Montelukast does not protect against hyperoxia-induced inhibition of alveolarization in newborn rats. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35:446–451.
8. Haque K, Mohan P. Pentoxifylline for neonatal sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4:CD004205.
9. Krakauer T. Pentoxifylline inhibits ICAM-1 expression and chemokine production induced by proinflammatory cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Immunopharmacology* 2000; 46:253–261.
10. Michetti C, Coimbra R, Hoyt DB, Loomis W, Junger W, Wolf P. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia. *J Surg Res* 2003; 115:92-99.
11. Naureckas ET, Factor P, Benjaminov O, Hoffer E, Sriram V, Sznajder JJ. Pentoxifylline does not protect against hyperoxic lung injury in rats. *Eur Respir J* 1994; 7:1397-1402.
12. ter Horst SAJ, Wagenaar GTM, de Boer E, van Gastelen MA, Meijers JCM, Biemond BJHM, Walther FJ. Pentoxifylline reduces fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 2004; 2014-2019.
13. Lauterbach R, Szymura-Oleksiak J. Nebulized pentoxifylline in successful treatment of five premature neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 1999; 158:607-610.

14. Rubin BK. Immunomodulatory properties of macrolides: overview and historical perspective. *Am J Med* 2004; 117(9A):2S-3S.
15. Tamaoki J, Kadota J, Takizawa H. Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. *Am J Med* 2004; 117(9A):5S-11S.
16. Reato G, Cuffini AM, Tullio V, Mandras N, Roana J, Banche G, Foa R, Carlone NA. Immunomodulating effect of antimicrobial agents on cytokine production by human polymorphonuclear neutrophils. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:150–154.
17. Lyon AJ, McColm J, Middlemist L, Fergusson S, McIntosh N, Ross PW. Randomised trial of erythromycin on the development of chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 78:F10–F14.
18. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1723–1729.
19. Northway WH Jr. Bronchopulmonary Dysplasia: Thirty-Three Years Later. *Pediatr Pulmonol* 2001; (Suppl) 25: 235-7.
20. Bland RD. Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biol Neonate* 2005;88:181-191.
21. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics* 2001;107:1-8.
22. Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol* 2003;8:63-71.
23. Duman N, Kumral A, Gülcan H, Özkan H. Outcome of very-low-birth-weight infants in a developing country: A prospective study from the west region of Turkey. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003 Jan;13(1):54-8.
24. Gülcan H, Üzümlü İ, Aslan S, Yoloğlu S. İnönü Üniversitesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen çok düşük doğum ağırlıklı preterm olgularımızın değerlendirilmesi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004;11(1):19-23.
25. Atasay B, Günlemez A, Ünal S, Arsan S. Outcomes of very low birth weight infants in a newborn tertiary center in Turkey, 1997-2000. *Turk J Pediatr* 2003;45:283-289.

26. Köksal N, Bayram Y, Baytan B. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde mekani ventilasyon tedavisi gören yenidoğanların retrospektif değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;28(1):1-4.
27. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003;8:73-81.
28. Groenman F, Ungre S, Post M. The molecular basis for abnormal human lung development. *Biol Neonate* 2005;87:164-177.
29. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:179-184.
30. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Ped Res* 2005;57(2):38R-46R.
31. Bancalari E, Claure N. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:164-170.
32. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate* 2001;79:205-209.
33. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F1-F3.
34. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1995;19(6):371-8.
35. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91:132-135
36. Jobe AJ. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 1999;46:641-643.
37. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:171-178.
38. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:60-67.
39. Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme. *Pediatr Res* 2006;59(2);185-109.
40. Atar MA, Donn SM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. *Semin Neonatol* 2002;7:353-360.

41. Rojas MA, Gonzales A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995;126(4):605-610.
42. Sweet DG, Halliday HL, Warner JA. Airway remodelling in chronic lung disease of prematurity. *Paediatr Respir Rev* 2002;3:140-146.
43. Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt, Gortner L. Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome? *Eur J Pediatr* 2002; 161:604-608.
44. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol* 2003;8:18-27.
45. Kazzi SN, Quasney MW. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme is associated with increased risk and severity of bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2005; 147:818-822.
46. Hislop AA. Bronchopulmonary dysplasia: prenatal and postnatal influences. *Pediatr Pulmonol* 2001;Suppl 23:107-109.
47. Rossi UG, Owens CM. The radiology of chronic lung disease. *Arch Dis Child* 2005;90:601-607.
48. Christou H, Brodsky D. Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *J Intensive Care Med* 2005;20(2):76-87.
49. Shah SS, Ohlsson A, Halliday H, Shah VS. Inhaled versus systemic corticosteroids for preventing chronic lung disease in ventilated very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;1:CD002058.
50. Pantalitschka T, Poets CF. Inhaled drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:703-708.
51. Ambalavanan N, Carlo WA. Bronchopulmonary dysplasia: new insights. *Clin Perinatol* 2004;31:613-628.
52. Ozer EA, Kumral A, Ozer E, Duman N, Yilmaz O, Ozkal S, Ozkan H. Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung in the newborn rat. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39:35-40.
53. Davis JM, Parad RB, Michele T, Allred E, Price A, Rosenfeld W; North American Recombinant Human CuZnSOD Study Group. Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase. *Pediatrics*. 2003;111(3):469-76.

54. Brion LP, Primhak RA, Yong W. Aerosolized diuretics for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3:CD001694.
55. Millar D, Schmidt B. Controversies surrounding xanthine therapy. *Semin Neonatol* 2004; 9:239-244.
56. Christou H, Brodsky D. Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *J Intensive Care Med* 2005;20(2):76-87.
57. Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Morgan D, Montgomery G, Grover TR, Abman SH. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289: L529–L535.
58. Habre W, Petak F, Ruchonnet-Metrailler I, Donati Y, Tolsa JF, Lele E, Albu G, Beghetti M, Barazzone-Argiroffo C. The role of endothelin-1 in hyperoxia-induced lung injury in mice. *Respir Res* 2006;7:45.
59. Rehan VK, Wang Y, Patel S, Santos J, Torday JS. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, prevents hyperoxia-induced neonatal rat lung injury in vivo. *Pediatr Pulmonol* 2006;41(6):558-69.
60. van Haaften T, Thebaud B. Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases. *Pediatr Res* 2006;59: 94R–99R.
61. Thadepalli H, Chuah SK, Iskandar L, Gollapudi S. Comparison of telithromycin, a new ketolide, with erythromycin and clarithromycin for the treatment of *Haemophilus influenzae pneumonia* in suckling, middle aged and senescent mice. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20:180-185.
62. Sarioglu S, Celik A, Sakar M, Sonmez D, Tekis D. Methenamine silver staining quantitative digital histochemistry in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2004; 36:2991-2.
63. Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M. Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2005; 58:32-8.
64. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004; 31:417-24.
65. Kavukcu S, Soylu A, Turkmen M, Kuralay F, Yilmaz O, Sarioglu S. Unilateral ureteroperitoneostomy in the management of hypoproteinemia in nephrotic rats with normal renal function. *Tohoku J Exp Med* 2003; 201:67-73.

66. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010:405-146.
67. Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme. *Pediatr Res* 2006; 59: 185–190.
68. Sue RD, Belperio JA, Burdick MD, Murray LA, Xue YY, Dy MC, Kwon JJ, Keane MP, Strieter RM. CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *J Immunol* 2004; 172:3860–3868.
69. Waheed S, D'Angio CT, Wagner CL, Madtes DK, Finkelstein JN, Paxhia A, Ryan RM. Transforming growth factor alpha (TGA(alpha)) is increased during hyperoxia and fibrosis. *Exp Lung Res* 2002; 28:361-372.
70. Hosford GE, Koyanagi KS, Leung WI, Olson DM. hyperoxia increases protein mass of 5-lipoxygenase and its activating protein, flap, and leukotriene b4 output in newborn rat lungs. *Exp Lung Res* 2002; 28:671-684.
71. Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van der Velden A, de Heer E, Hiemstra PS, Poorthuis BJ, Walther FJ. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(6):782 – 801.
72. Matsune S, Sun D, Ohori J, Nishimoto K, Fukuiwa T, Ushikai M, Kurono Y. Inhibition of vascular endothelial growth factor by macrolides in cultured fibroblasts from nasal polyps. *Laryngoscope* 2005; 115:1953–1956.
73. Pinto LA, Camozzato C, Avozani M, Machado DC, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Effect of clarithromycin on the cell profile of bronchoalveolar lavage fluid in mice with neutrophil-predominant lung disease. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004; 59(3):99-103.
74. Kadota J, Mizunoe S, Kishi K, Tokimatsu I, Nagai H, Nasu M. Antibiotic-induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. *Int J Antimicrobial Agents* 2005; 25:216–220.
75. Shinkai M, Rubin BK. Macrolides and airway inflammation in children. *Paediatr Respir Rev* 2005; 6:227–235.
76. Hosford GE, Koyanagi KS, Leung WI, Olson DM. Hyperoxia increases protein mass of 5-lipoxygenase and its activating protein, flap, and leukotriene b4 output in newborn rat lungs. *Exp Lung Res* 2002; 28:671-684.

77. Burghardt JS, Boros V, Biggs DF, Olson DM. Lipid mediators in oxygen-induced airway remodeling and hyperresponsiveness in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:837-842.
78. Spinozzi F, Russano AM, Piattoni S, Agea E, Bistoni O, de Benedictis D, de Benedictis FM. Biological effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene receptor-antagonist, on T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1876-1882.
79. Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline. *Cytokine* 2002;20(6):247–255.
80. Lauterbach R, Pawlik D, Zembala M, Szymura-Oleksiak J, Lisowska-Miszczuk I, Kowalczyk D, Bury J. Pentoxifylline in prevention and treatment of chronic lung disease. *Acta Paediatr Suppl* 2004; 444:20-22.
81. Yonemaru M, Hatherill JR, Hoffmann H, Zheng H, Ishil K, Raffin TA. Pentoxifylline does not attenuate acute lung injury in the absence of granulocytes. *J Appl Physiol* 1991; 71(1): 342-351.