

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

**DENEYSEL BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNDE
AKTİVE PROTEİN C TEDAVİSİ**

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YANDAL UZMANLIK TEZİ

Dr. DİDEM YEŞİLIRMAK

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. ABDULLAH KUMRAL

İZMİR 2009

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

DENEYSEL BRONCOPULMONARY DİSPLAZİ
MODELİNDE AKTİVE PROTEİN C TEDAVİSİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YANDAL UZMANLIK TEZİ

Dr. DİDEM YEŞİLİRMAK

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. ABDULLAH KUMRAL

İZMİR 2009

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim, tez konumun sečilmesi ve çalıőmalarımın yürütülmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Abdullah Kumral'a; eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen baőtta Prof.Dr. Hasan Özkan ve Doç.Dr. Nuray Duman olmak üzere Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine; eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren eőtım ve ailem ile tüm çalıőma arkadaşlarıma teőkükür ederim.

Dr. Didem Yeőtılırmak

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Yenidoğan Bilim Dalı

Yandal Uzmanlık Öğrencisi

İzmir 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
İçindekiler.....	I-II
Tablo listesi.....	III
Şekil listesi.....	III
Kısaltmalar.....	IV
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ	3-4
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.A.KRONİK AKCİĞER HASTALIĞI.....	4
2.A.1 Tanım.....	4
2.A.2 Tarihçe.....	4
2.A.3 Görülme sıklığı.....	5
2.A.4 Patofizyoloji.....	5-8
2.A.5 Etyoloji / risk faktörleri.....	8-10
2.A.6 Klinik bulgular ve prognoz.....	10-11
2.A.7 Korunma.....	11-13
2.A.8. Tedavi.....	14-15
2.B.AKTİVE PROTEİN C	
2.B.1. Yapısı, sentez ve aktivasyonu.....	15-16
2.B.2. Biyolojik fonksiyonları.....	16-18
2.B.3. Medikal uygulamalar.....	18-20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20

3.1 Hayvan modeli ve tedaviler.....	20
3.2 Doku hazırlığı.....	20-21
3.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi.....	21
3.4 Alveolar alanın morfometrik ölçümü.....	21
3.5 Düz kas aktin ekspresyonunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi	21-22
3.6 Sitokin ekspresyonlarının değerlendirilmesi.....	23
3.7 Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler.....	23
4.BULGULAR.....	24-26
5.TARTIşMA.....	27-30
6.SONUÇLAR.....	30
7. KAYNAKLAR.....	31-36

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1: Bronkopulmoner displazi tanısal kriterlerinin tanımlanması	4
Tablo 2: BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler.....	7
Tablo 3: BPD'nin prognozu.....	11
Tablo 4: Gruplara göre ortalama alveol alanı değerleri.....	24
Tablo 5: Deney gruplarında fibrozis skorlarına göre dağılım	25
Tablo 6: Gruplara göre aktin skorları.....	26
Tablo 7: Gruplara göre sitokin ekspresyonları.....	26

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Çalışma gruplarının akciğer morfolojileri.....	24
Şekil 2: Grupların Aktin Boyamaları	25

KISALTMALAR

APC	Aktive Protein C
BPD	Bronkopulmoner Displazi
EPCR	Endotelyal Protein C Reseptörü
GH	Gestayonel Hafta
IL1- β	İnterlökin 1 beta
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
PDA	Patent Duktus Arteriozus
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RDS	Respiratuar Distres Sendromu
TGF- β	Transforming Growth Factor - β
TNF α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

DENEYSEL BRONKOPULMONER DİSPLAZİ MODELİNDE AKTİVE PROTEİN C TEDAVİSİ

Özet:

Giriş:

Broncopulmonary displazi prematüre bebeklerin akciğerlerinde inflamasyon, fibrozis, ve gelişim defektleri ile ortaya çıkar. Aktive Protein C (APC) antikoagülan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bir serin proteazdır. Sunulan bu çalışmada, hiperoksik akciğer hasarlanması olan ratlarda intraperitoniyal verilen aktive protein C (APC)'nin terapötik etkilerini değerlendirdik.

Metod:

Çalışma postnatal 3. günde başlayıp 13. güne kadar devam etti. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Grup 1'de bulunan sıçanlar (n=14) kontrol grubu olarak oksijene maruz bırakılmayıp oda havasında tutuldu. Grup 2 (salin ve hiperoksi) ve 3 (APC tedavisi ve hiperoksi) pleksiglastan imal edilen kapalı alanda tutuldu. Tüm sıçanlar postnatal 14. günde sakrifiye edildi. Akciğer dokusu torokotomi ile çıkarıldı. Histopatolojik araştırma ve sitokin ekspresyonları değerlendirildi.

Sonuçlar:

Vasküler konjesyon, küçük hava yollarındaki elastik liflerde azalma, alveoller arası septumda kalınlaşma ve diffüz alveolar tıkanma APC tedavisi ile düzeltilmiştir. IL-1 beta, IL-6 and TNF-alfa gibi sitokin ekspresyonları istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır.

Tartışma:

Bizim sonuçlarımız hiperoksi süresince uygulanan APC tedavisinin alveolar yapıyı koruduğu ve fibrozisi azalttığını göstermiştir. O nedenle, biz preterm infantlarda APC tedavisi ile BPD gelişimi riskinin azaltılacağı sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler:

Aktive protein C; bronkopulmoner displazi; hiperoksi; proinflamatuvar sitokinler

ACTIVATED PROTEIN C TREATMENT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF BRONCOPULMONARY DYSPLASIA

Summary:

Backraund:

Broncopulmonary dysplasia occurs with inflammation, fibrosis, and maturation defects of lungs of preterm babies. The serine protease activated protein C (APC) possesses prominent anticoagulant and anti-inflammatory actions. In the present investigation, we evaluated therapeutic effect of intraperitoneal instillation of APC on the hyperoxic lung injury in the rat.

Metod:

The experiment was begun on postnatal day 3 and continued through postnatal day 13. Three groups were defined. The rats belonging to group 1 were designated as control group and kept in room air without exposure to hyperoxia. Group 2 (saline with hyperoxia), Group 3 (APC treatment with hyperoxia) were kept in Plexiglas chamber. All of the rats are sacrificed postnatally on the 14th day. Lung tissues are removed by toracotomy. Histopathologic research and cytokine expressions were evaluated.

Results:

Vascular congestion, decrease in elastic fibrills in small airways, thickening of the interalveoler septum and diffuse alveolar obstruction were getting better with APC therapy. Cytokine expressions like IL-1 beta, IL-6 and TNF-alfa are also statistically diminished.

Conclusions:

Our results suggest treatment with APC during hyperoxia exposure is associated with improved alveolar structure, and decreased fibrosis. Therefore, we conclude that treatment of preterm infants with APC might reduce the risk of developing BPD.

Key words:

Activated protein C; broncopulmonary dysplasia; hyperoxia; proinflammatory cytokines

1. Giriş

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

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

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

Protein C hepatositlerde K vitaminine bağımlı olarak üretilen bir serin proteazı olup dolaşımında inaktif formdadır, aktive olmadıkça antikoagülan etki göstermez. Koagülasyon sırasında ortaya çıkan trombin damar endotel hücrelerinin yüzeyindeki trombomoduline bağlanır ve protein C aktivasyonu başlar. Aktive protein C antikoagülan etkisini proteoliz ile FVIIIa ve FVa’yı inaktive ederek gösterir. Mekanizması tam anlaşılmamış bir yoldan plazminojen aktivatör inhibitörü – 1’i (PAI – 1) endotelial protein C reseptörü (EPCR) aracılığıyla nötralize ederek endotelial bariyer bütünlüğünü düzenler, güçlü antienflamatuvar, antiapoptotik, proliferatif etkinlik gösterir (4). Literatürde damar yolu ile verilen APC’nin lipopolisakkarit ile gelişen pulmoner damarsal hasarlanmayı önlediği, lökosit infiltrasyonu, damar geçirgenliği ve intersitisyel ödem gelişimi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sıçan astma modelinde inhalasyon yolu ile verilen rhAPC’nin antienflamatuvar etkinliği de kanıtlanmıştır (5).

Yenidoğan farelerde EPCR ekspresyonunun erişkinlere göre daha düşük olduğu gösterilmiş, ancak postnatal 7. günde sayı ve dağılım açısından benzer özellik kazanılmıştır (6). Protein C düzeyleri zamanında doğan bebeklerde erişkin düzeylerinin

sadece %40'ı kadar olup prematüre bebeklerde daha da düşüktür. Protein C yolundaki bu doğumsal eksiklikler yenidoğanın antienflamatuvar ve antikoagülan mekanizmalarının defektif olması ile sonuçlanabilir (7).

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

2.Genel Bilgiler

2.A.Kronik Akciğer Hastalığı

2.A.1 Tanım

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

Tablo 1. Bronkopulmoner displazi tanısal kriterlerinin tanımlanması

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

^a Tüm infantlar en az 28 gün süreyle oksijen ($FiO_2 > \%21$) tedavisi almış olup süregelen solunum sıkıntısı bulguları göstermelidir.

* Hangisi daha önce olursa

2.A.2 Tarihçe

Bronkopulmoner displazideki tarihsel gelişime baktığımızda; Northway ve arkadaşları 1967 yılında, ağır RDS gelişen prematüre bebeklerde, altı günü aşan sürede aralıklı pozitif basınçlı mekanik ventilasyon ve yüksek konsantrasyonda oksijen tedavisi sonrası ortaya çıkan yeni bir kronik akciğer hastalığı olarak BPD'yi tanımladı (8). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yapılan ulusal bir çalışmanın sonucunda günümüzde de geçerli olan BPD tanımı ortaya çıktı (Tablo 1) (9).

2.A.3 Görülme sıklığı

Değişik toplumların hastalığa duyarlılığı, tedavide uygulanan farklı protokoller ve uzun yıllar boyunca hastalığın yerleşik bir tanımlaması olmamasından dolayı literatürde bildirilen BPD görülme sıklığı değişkenlik göstermektedir. Buna rağmen BPD erken bebeklik döneminin en sık görülen kronik akciğer hastalığıdır (10).

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 gestasyonel haftada (GH) oksijen gereksinimi olduğu bildirilmiştir (11). 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 (12).

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 (13-16). İnsidansların geniş bir aralıkta bildirilmesi BPD tanımı, hasta takibi ve çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere oranlarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (1).

2.A.4 Patofizyoloji

2.A.4.1 Normal akciğer gelişimi

Akciğer gelişimi mekanik ve humoral birçok faktörden etkilenir. Mevcut bilgiler ışığında insanlarda akciğer gelişimi aşağıda belirtilen beş bölüme ayrılabilir (17, 18).

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 bronşioler 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 apopitotik ve anti-apopitotik 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 (19).

2.A.4.2 Eski ve yeni BPD patolojisi

Yenidoğanlara mekanik ventilasyon uygulaması başlamadan önce ağır RDS geçiren bebekler ya ölmekte ya da sekelsiz iyileşmekteydiler. Mekanik ventilasyon uygulanmaya başladıktan sonra ortaya çıkan bu hastalık ilk defa Northway ve arkadaşları tarafından 1967 yılında tanımlandı. Gelişmekte olan akciğerin havayollarında ve parankiminde hem hasar hem de kısmî onarım görüldüğü için hastalığa bronkopulmoner displazi adı verildi (8).

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 müsküler ve submukozal bez hiperplazisi ile mukozal skuamöz metaplazi görülmekte idi. Müsküler hipertrofi, endotelyal hücre hiperplazisi ve azalmış arteriol sayısı vasküler yatakta görülen değişikliklerdi (2).

Günümüzde, antenatal kortikosteroidlerin yaygın kullanımı, postnatal sürfaktan ve daha az agresif mekanik ventilasyon gibi iyileştirilmiş neonatal yoğun bakım

uygulamaları sonucunda, akciğer gelişimini tamamlamamış çok düşük doğum ağırlıklı prematürelere hayatta kalma oranı artmaktadır (3). 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 (4).

Tablo 2. BPD patolojisinde yıllar içinde gözlenen değişimler (17)

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

2.A.4.3 Akciğer hasarının meydana geliş şekilleri

Bronkopulmoner displazi gelişim sürecinde önemli etkisi olan dört ana mekanizmadan, 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 aracılıkların rol oynadığı görülmüştür (20). İnflamatuvar hücrelerden özellikle nötrofillerin önemli rol oynadığı, hiperoksik akciğer hasarı geliştirilen nötrofilden yoksun hayvanlarda hiperoksinin daha az hasar verdiği gözlenmiştir (21, 22). 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 (21, 23).

2. Yapısal bozukluklar

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

3. Fibroproliferasyon

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

4. Gelişim bozulması/gecikmesi

Belirgin inflamasyon ve fibrozis bulgusu olmaksızın akciğer gelişiminde duraklama olması yeni BPD'nin başlıca özelliklerindedir (9). Fizyolojik gelişim sürecinde endojen glikokortikoidler ve retinoidler akciğer gelişimini olumlu yönde etkilerken, TGF- β 'nin inhibitör etkisi de değişimin dengede tutulmasına katkıda bulunur (2, 9).

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 (24).

DeneySEL hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, hiperoksi, hipoksi, mekanik ventilasyon ve yetersiz beslenme gibi birçok faktörün etkisinin hangi ortak son yol aracılığı ile olduğu net olarak bilinmese de, sonuçta akciğer septasyonunu azalttığı görülmüştür. TNF- α , TGF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin aşırı salgılanması, fizyolojik dozlarından daha fazla glikokortikoid uygulanması, VEGF ekspresyonunun azalması ve angiogenezisin inhibisyonu gibi faktörler alveoler gelişimin bozulmasına neden olmaktadır (2, 9, 18).

2.A.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, 8). Bu faktörler;

1. Prematür doğum:

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

2. Oksijen:

Oksijen organizma için hayati bir gereksinimdir. Ancak, tıbbi nedenler ile oksijen uygulamasının akciğer üzerine hasarlı etkileri hem insan hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Yenidoğan hayvanlara sadece oksijen uygulaması sonucunda bile BPD patolojisi ile çok benzer bulgular elde edilmiştir. Verilen oksijenin düzeyi arttıkça ortaya çıkan hasarın boyutu da artmaktadır (25). 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 (26). Hiperoksinin distal havayolu dallanmasında duraklamaya apoptozu arttırarak neden olduğu öne sürülmüştür (27). Prematüre yenidoğanlarda doğumda antioksidan düzeylerinin oksijen toksisitesine engel olacak miktarda bulunmadığı bilinmektedir (25).

3. Mekanik ventilasyon:

Yenidoğanlarda solunum sıkıntısı olduğunda kaçınılmaz tedavi yöntemi olan mekanik ventilasyon, aynı zamanda, yüksek basınçlar nedeniyle barotravma, akciğer hacminin artmasıyla volütravma, yetersiz sürfaktana sahip alveollerde tekrarlayan açılma ve kapanmalar yapmasıyla atelektotravma ve sonuçta artmış proinflamatuvar sitokinler nedeniyle biyotravmaya yol açarak akciğer hasarına neden olur (2, 26).

4. Enfeksiyon:

Hem prenatal hem de postnatal enfeksiyonların BPD riskini arttırdığı görülmüştür. Düşük şiddette, asendan gelişen koryoamnionit hem erken doğuma yol açmakta hem de mekanik ventilasyon veya oksijen tedavisi almayan bebeklerde pulmoner inflamasyona neden olarak BPD riskini arttırmaktadır (20, 28).

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, 4). 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 (29). Ek olarak, ACE geninde saptanan polimorfizmin BPD sıklığı ve şiddeti ile ilişkili olduğu görülmüştür (30).

6. Diğer etkenler:

Semptomatik PDA'nın BPD gelişimine katkısı olduğu görülmüştür (31). Akciğerlerin yaşa göre beklenenden küçük olması, annenin gebelik döneminde sigara kullanması da BPD açısından risk arttırıcı diğer etmenler olarak tanımlanmıştır (32).

2.A.6 Klinik bulgular ve prognoz

Mekanik ventilasyon öncesi dönemde, RDS'li infantlar ölmekte veya solunum sıkıntısı olmaksızın iyileşmekteydi (8). Sürfaktan ve antenatal steroid uygulaması ile BPD epidemiyolojisi, patolojisi ve kliniği belirgin olarak değişmiştir (3).

Günümüzde BPD'li infantların yaklaşık üçte ikisinin doğum ağırlığı 1,000 gramdan az ve doğum haftası 28 haftanın altındadır. Bu infantların postnatal dönemde solunum desteği almasının nedeni ağır RDS'den daha sık olarak, apne ve yetersiz solunum çabasıdır. Patent duktus arteriozus, pnömoni veya sepsis, solunum desteği süresini uzatan ve inflamasyonu arttıran faktörler olarak öne çıkmaktadır (10).

Günümüzde Northway ve arkadaşlarının tanımladığı radyolojik görünüm karışımıza nadir olarak çıkmaktadır (8). Bunun yerine, akciğer grafisinde atelektazi, havalanma artışı alanları, çizgisel interstisyel opasiteler ve kistik alanlar görülebilmektedir (33).

Hastalığın kısa ve uzun dönemde istenmeyen sonuçları mevcuttur. (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, 8).

Tablo 3. BPD'nin prognozu

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

2.A.7 Korunma

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

2.A.7.1 Erken doğumun önlenmesi

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

2.A.7.2 Doğum öncesi tedaviler

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

2.A.7.3 Sürfaktan tedavisi

Sürfaktan, akut akciğer hasarı tedavisinde çok başarılı olmuştur ancak prematüre bebeklerde BPD görülme sıklığına etki etmemiştir. Bu durum, BPD gelişme

riski yüksek olan çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hayatta kalma oranının artması ile açıklanabilir (1).

2.A.7.4 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

Postnatal glikokortikoid uygulaması ilk uygulandığında BPD sıklığını azaltmış olsa da uzun dönemde ortaya çıkan istenmeyen etkileri nedeniyle kullanılması halen tartışmalıdır (34). Ancak 7-14 gün arası başlanan steroid tedavisinin mortalite ve BPD gelişimini nörolojik prognozu kötü etkilemeksizin azalttığı yakın dönemde gösterilmiştir. Antienflamatuvar amaçla kromolin sodyum ve bronkodilatör olarak salbutamol tedavisi BPD gelişimini önlemede etkisiz bulunmuştur (35).

2.A.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.A.7.6 Sıvı tedavisi

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

2.A.7.7 Enfeksiyonların tedavisi

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

2.A.7.8 Mekanik ventilasyon uygulamaları

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

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

yaklaşım sürfaktan uygulamasını takiben hastanın ekstübe edilerek nCPAP'a alınmasıdır. Volüm garantili ventilasyon stratejilerinin kullanılması metaanaliz sonucuna göre ventilasyon süresi ve pnömotoraks sıklığını azaltmakla beraber BPD insidansını sınırdan azaltmaktadır (2).

Son yıllarda yapılan çalışmalar inhale nitrik oksit'in faydalı olabileceği yönündedir. Ancak olası nörolojik yan etkileri göz önüne alınarak daha ileri çalışmalar gerekmektedir (2, 36).

2.A.7.9 Antioksidan ve beslenme tedavileri

İmmatür akciğerde reaktif oksijen türevlerinin yol açtığı hasarın BPD gelişimindeki etkisi iyi bilinmektedir (26). Buradan yola çıkarak yapılan insan çalışmalarında intratrakeal CuZn süperoksit dismutaz ve intravenöz N-Asetilsistein tedavileri, BPD gelişimini önlemede beklenen etkiyi gerçekleştirememiştir. Deney hayvanlarında intravenöz metalloporfirin kullanıldığında, hiperoksik hasarın kısmen geri çevrildiği görülmüştür (36).

Prematüre bebekler sınırlı kalori ve mikronutrient deposu ile doğmaktadır. Yoğun kalori desteğinin BPD gelişimini önleyemediği görülmüş, ancak çeşitli mikronutrient tedavilerinden olumlu sonuçlar alınmıştır (37). Solunum yolu epiteliyal hücrelerinin bütünlüğünün sağlanması için A vitamini esansiyel özelliكتedir. A vitamini eksikliği akciğer sekresyonlarının klirensinin azalmasına, trakeobronşiyal epitelde sıvı homeostazının bozulmasına, silia kaybına, akciğer hasarlanmasının tamirinin yetersiz olmasına ve sonuç olarak akciğer kompliyansında azalmaya yol açar. ELBW infantların serum ve doku retinol düzeyleri düşük olduğundan 1000g altı bebeklere 5000 U/ doz, IM, haftada 3 gün ve toplam 12 doz olacak şekilde ilk haftadan itibaren kullanılan A vitamininin BPD insidansını azalttığı gösterilmiştir (36).

2.A.7.10 Umut verici yaklaşımlar

Henüz birkaç çalışma ile yararlı olduğu gösterilen ancak çok merkezli klinik çalışmalar ile desteklenmesi gereken yaklaşımlar arasında inositol desteği, proteinaz inhibitörleri, antisitokin tedavileri, rekombinant süperoksit dismutaz ve gen tedavisi sayılabilir (2, 36).

2.A.8. Tedavi

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

2.A.8.1 Oksijen/Vazodilatörler

Oksijen tedavisi, hipoksik infantlarda solunumsal belirtileri geriletir ve büyümeyi destekler. Ağır BPD olgularında kliniğin bir parçası olan pulmoner hipertansiyonda, oksijenin vazodilatör etkisi ile pulmoner arter basınçları geriler. Ancak en uygun oksijen saturasyonu veya PO₂ konusunda görüş birliği yoktur. Nifedipin ve inhale nitrik oksit gibi vazodilatör ajanlar pulmoner damar direncini azaltarak oksijenizasyonun düzelmesine katkıda bulunurlar (2, 38).

2.A.8.2 Diüretikler

İnterstisyel alveolar ödemin giderilmesi amacıyla diüretikler uzun süre kullanılmıştır. Ancak faydasının akut ve sınırlı olması, metabolik yan etkilerinin varlığı ve uzun süreli kullanım sonuçları konusunda yeterli bilgi olmaması nedeniyle sistemik veya aerosol şeklinde furosemidin BPD tedavisinde rutin kullanımı önerilmemektedir (38).

2.A.8.3 Antienflamatuvar ve bronkodilatör ilaçlar

İnhale ve sistemik bronkodilatörler BPD tedavisinde çok sık kullanılırlar. İnhale β -agonist (salbutamol, izoproterenol) ve antikolinerjik (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).

2.A.8.4 Mukolitikler

Randomize çalışmaları olmamakla birlikte intratrakeal veya nebülize dornase – α kullanımı BPD'de görülen mukus tıkaçlarını önlemekte başarılı görünmektedir (2).

2.A.8.5 Beslenme

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

2.A.8.6 Glikokortikoidler

Kısa ve uzun dönemde gelişen çeşitli metabolik, nörolojik ve gastrointestinal komplikasyonlar nedeniyle glikokortikoidler tedavide rutin kullanımdan çıkmıştır (2, 36).

2.A.8.7 İkincil hastalıkların önlenmesi

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

2.A.8.8 Umut verici tedaviler

Var olan tedavilerinin geliştirilmesi ve yenilerinin araştırılması hem hayvan hem de insan çalışmaları ile sürmektedir (2, 38). Neonatal hiperokside rekombinan insan VEGF tedavisinin normal akciğer yapısının kazanılmasını sağladığı görülmüştür (39). Akciğer parankiminde bulunan Endotelin 1 reseptörlerinin tezosentan ile bloke edilmesi sonucunda hiperoksik akciğer hasarı önlenmiştir. Bir peroksizom proliferatör aktivatör reseptör agonisti olan rosiglitazon, deneysel hiperoksik akciğer hasarı tedavisinde olumlu etkide bulunmuştur. Deneysel BPD'de kök hücre tedavisinin yeri henüz tartışmalıdır (40).

2.B.Aktive Protein C

2.B.1. Yapısı, sentez ve aktivasyonu

Protein C 62 kDa ağırlığında, 419 aminoasitten oluşan doğal antikoagülandır. Esas olarak karaciğerde sentez edilir, ancak damar endotel hücreleri ve cilt keratinositlerinden de sentezlenebildiği gösterilmiştir. Hasarlanan dokuda endotel hücresi ve monositler doku faktörünü açığa çıkarır, bu faktör ekstrinsik koagülasyon yolunu aktive eder (41, 42). Hücre yüzeyinde trombin, trombomodulinle bağlandığında

antikoagulan yanıt başlatılmış olur. Trombin-trombomodulin kompleksi EPCR varlığında protein C'yi aktif formuna dönüştürür. Protein C'nin EPCR'ye bağlanması PC'nin trombin-trombomodulin kompleksi tarafından aktivasyonunu yaklaşık 20 kat artırır (6).

Aktive protein C serin proteaz karakteristiği gösterir. Protein C dolaşımında 70 nM civarında bulunurken APC çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunur. Serin protez inhibitörlerine dirençli olup alfa-1 antitripsin, alfa-2 makroglobulin ve protein C inhibitörü tarafından inhibe edilir. Plazma yarı ömrü diğer serin proteazlardan daha uzun olup yaklaşık 20 dakikadır (42).

2.B.2. Biyolojik fonksiyonları

2.B.2.1. Antikoagulan aktivite:

Aktive protein C antitrombotik, profibrinolitik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklere sahiptir. Protein C antikoagulan sisteminin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Protein S kofaktörü olup APC, Faktör Va ve VIIIa'yı inhibe eder, trombin yapımını azaltarak koagülasyon kaskadını yavaşlatır. İlave olarak APC plasminojen aktivatör inhibitörüne bağlanarak plasminojenin plasmine dönüşmesinin inhibe edilmesini engeller, fibrinolizisi de başlatır (43).

2.B.2.2. Antiinflamatuvar aktivite:

Koagülasyon üzerine olan etkilerinden bağımsız olarak proinflamatuvar sitokinleri, inflamatuvar ajanların endotel hasarlanmasını ve lökosit birikimini azaltarak antiinflamatuvar özellik gösterir. Antikoagulan özelliklerinden bağımsız olarak farklı hücre tiplerindeki EPCR aracılığıyla antiinflamatuvar özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. APC direk NF-kappaB p50 ve p52 alt ünitelerinin ekspresyonunu baskılar, TNF-alfa, hücre adezyon molekülleri olan hücre içi adezyon molekülü-1, damar adezyon molekülü-1 ve E-selektin ekspresyonunu bloke eder. Aktive protein C indirekt olarak, trombin oluşumunu inhibe ederek de antiinflamatuvar etkinlik sağlar. Sitokin üretimini, nötrofil kaynaklı hasarı azaltır, nötrofil aktivasyonunu azaltır. NF- kappaB oksidatif strese hücre adezyonu, apoptozise aracılık eder, trombin tarafından indüklenen inflamatuvar yolağa katılır. Yapılan çalışmalarda lipopolisakkarit aracılığıyla oluşturulan akciğer inflamasyonunda, intravenöz yolla verilen APC tedavisinin bronkoalveolar lavaj sıvısında nötrofil toplanmasını azalttığı, prokoagulan aktiviteyi baskılamasından

bağımsız olarak sitokin ve kemokin salınımını azalttığı gösterilmiştir (44). Deneysel çalışmalarda ağır PC eksikliği olan farelerin akut enflamatuvar yanıtının aşırı olduğu gösterilmiştir (43).

Aktive protein C'nin ağır sepsiste etkinlik ve güvenilirliğinin [Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS)] araştırıldığı prospektif, randomize, çift kör, çok merkezli, çok uluslu, çalışmada 1690 ağır sepsis hastasında serum D-dimer düzeyleri hem tedavi, hem de plasebo grubunda yüksek iken drotrecogin alfa infüzyonu sırasında D-dimer düzeylerinde anlamlı olarak düşme saptanmıştır. Sepsiste erken dönemde PAI-1 düzeyleri artar ve zamanla azalır, bu çalışmada PAI-1 düzeylerinde düşme çok daha fazla olmuş, plazminojen düzeyleri daha yüksek olarak bulunmuş, bu da fibrinolizise gidişi desteklemiştir. Ayrıca serum IL-6 düzeyleri APC ile anlamlı olarak düşmüş, bu bulgu APC'nin ağır sepsis hastalarındaki antiinflamatuvar etkisini onaylamıştır (45). Tüm hastalar değerlendirildiğinde drotrecogin alfa grubunda 28 günlük mortalite % 24.7 iken, plasebo grubunda % 30.8 olmuş, mortalitede drotrecogin alfa ile % 6 kesin, %19 göreceli azalma saptanmıştır (45).

2.B.2.3.Antiapoptotik ve proliferatif aktivite:

Aktive protein C, Bcl-2 ve Bax modülasyonu, caspase 3 ve 8 inhibisyonu sonucu apoptoza giden hücre sayısını azaltır. İlave olarak APC matriks metalloproteinaz-2 aktivitesini arttırarak endotelial hücreler ile keratinositlerin proliferasyonunu uyarır (44).

Protetik etkilerini EPCR aracılığıyla gösterir. Ancak EPCR direk hücre sinyal yollarını etkilemez. Aktive protein C -EPCR bağlanınca PAR-1 aktive olur, trombin ve APC PAR-1'in aynı bölgesine bağlanabilir. Trombin bağlanması trombosit aktivasyonu, artmış damar geçirgenliği, NF-kB aktivasyonu ve artmış enflamatuvar sitokinler ile enflamatuvar yanıtı başlatır. APC bağlandığında ise trombin aksine hücre geçirgenliğini, endotelial adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin ekspresyonunu ve monosit migrasyonunu azaltır (41).

2.B.2.4.Bariyer Stabilizasyonu:

Endotelial hücreler, kan ile doku arasındaki bariyeri dinamik olarak düzenlerler. Sepsis gibi enflamatuvar bozukluklar bariyerin yıkılmasında anahtar rol oynar. Aktive protein C endotelial EPCR'ne bağlanıp PAR-1 aracılı olarak sifingozini sfingozin 1

fosfata dönüştürür, bariyer bütünlüğünü düzenler. Hücre iskeletini stabilize eder, endotel geçirgenliğini azaltır (46).

Protein C düzeyleri zamanında doğmuş yenidoğanlarda erişkin düzeylerinin %40'ı kadar olup premature bebekler için bu oran daha da düşüktür. Protein C düzeylerinin düşük olması preterm bebeklerin antikoagülan ve antiinflamatuvar defektli olmalarına katkı sağlıyor olabilir.

2.B.3. Medikal uygulamalar:

Antikoagülan olarak bilinen APC'nin antiinflamatuvar, antiapoptotik ve bariyer stabilizasyon etkinliği ve hücre büyümesi ve migrasyonu üzerine olan pozitif etkileri nedeniyle pek çok hastalıkta tedavi edici özelliklerinden faydalanılmaktadır.

2.B.3.1. Sepsis:

Ağır sepsis çoklu organ yetersizliği ve ölümlü sonuçlanabilen kompleks bir hastalıktır. Büyük PROWESS çalışmasında APC tedavisinin mortaliteyi azalttığı gösterilmiş, artık ağır sepsis tedavisinde drotrecogin alfa (Xigris, Lilly) onaylanmış, yüksek ölüm riskli, akut organ disfonksiyonu olan hastalarda kullanılmaktadır. Bazı hastalarda özellikle çocuklarda kanama komplikasyonu gözlenmiştir (45).

2.B.3.2. Spinal kord hasarlanması:

Aktive protein C antikoagülan etkilerinden bağımsız olarak nöroprotektif özellik gösterir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda basıyla oluşturulan spinal hasarlanmada motor hasarlanmayı azalttığı gösterilmiştir. TNF-alfa ve nötrofillerin hasar alanında azaldığı saptanmıştır. İskemik spinal kord hasarlanması modelinde APC tedavisi fonksiyonel defisiti düzeltmiş, motor nöronların sayısını arttırmıştır (47).

2.B.3.3. Beyin hasarı ve inme:

İskemik inmenin tedavisinde APC etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (42). Artmış PC düzeyleri insanlarda azalmış iskemik inme ile ilişkili bulunmuştur. Fokal serebral iskemik uygulanan sıçan modellerinde APC iskemik hemisferdeki serebral kan akımını arttırmış, gözlenen beyin hasarı volümünü azaltmış, bu etkilerini EPCR-PAR-1 aracılığıyla antikoagülan özelliğinden bağımsız olarak göstermiştir. Ayrıca endotelial hücre apoptozisini inhibe ederek direk nöronal ağın işlevselliği ve bütünlüğünü korumuştur (48).

2.B.3.4.Romatoid artrit:

Romatoid artrit çok sayıda sinoviyal eklemi tutan, kemik ve kıkırdak doku yıkımı ile sonuçlanabilen süregen enflamasyon ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Romatoid artritli hastaların sinoviyal yüzey hücreleri ve endotelial hücrelerinde PC/APC MMP-2 ile beraber bulunmuştur. APC direk NF-κB'yi inhibe ederek antienflamatuvar etkinlik göstermiş, deneysel olarak gösterilmiş olan bu etkinlik in vivo olarak ispatlanamamıştır (48, 49).

2.B.3.5.Böbrek hasanması:

Böbrek iskemi reperfüzyon hasarı, akut böbrek yetmezliğindeki en önemli mekanizmadır. Aktive protein C tedavisi antikoagülan etkinlik göstermeksizin iskemi reperfüzyon hasarındaki lökosit aktivitesini baskılayarak koruyucu etkinlik göstermiştir. Diabetik nefropatide endotelial ve podosit apoptozisini baskıladığı da gösterilmiştir (50).

2.B.3.6.Akciğer hastalıkları:

Enflamatuvar akciğer hastalığı olan hastalarda APC'nin faydalı etkileri gösterilmiştir. Protein C'nin aktivasyonu bronşiyal astmalı hastalarda sekresyon miktarını azaltmış, sıçan modellerinde inhalasyon yolu ile kullanılan APC'nin T hepler 2 sitokin yanıtını, immunglobülin E, eosinofilik enflamasyonu ve hava yolu hiperaktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (51). Fare astma modellerinde damar yolu ile verilen APC'nin T hepler 2 ile uyarılan immunolojik ve enflamatuvar yanıtı baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan çift kör, plasebo kontrollü klinik çalışmada APC'nin endotoksinle uyarılan akciğer hasarlanmasında pulmoner enflamasyonu ve alveolar lökosit birikimini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır (52).

2.B.3.7.Yara iyileşmesi:

Aktive protein C yeni kan damarı oluşumunu ve ektodermal epitelial hücrelerin migrasyonunu artırır. Sıçanlarda yara iyileşmesi modellerinde biyopsi alınan bölgelerde toksisite görülmeksizin topikal kullanılan APC'nin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Etki mekanizması kompleks olup enflamasyonun baskılanması, anjiogenezisin uyarılması, reepitelizasyon ve antiapoptotik etkinliği içermektedir (53).

İn vitro, prelinik ve klinik veriler pek çok hastalıkta APC'nin farmakolojik kullanımının mümkün olduğu gösterilmiş olmakla beraber kronik akciğer hastalığındaki kullanımına ilişkin çalışma bulunmamaktadır.

3. Gereç ve Yöntem

3.1 Hayvan modeli ve tedaviler

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu onayı alınan bu çalışma, aynı üniversitenin Deneysel Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Gebeliği planlanmış Wistar suşu sıçanların kendiliğinden doğan yavru sıçanları, üç 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 42 yavru yenidoğan sıçan yer aldı (37). Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Grup 1'de bulunan sıçanlar (n=14) kontrol grubu olarak oksijene maruz bırakılmayıp oda havasında tutuldu. Grup 2 ve 3 pleksiglastan imal edilen kapalı alanda 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.

3.1.1 Çalışma grupları

Grup 1 (n=14): Oda havasında kalan, oksijene maruz bırakılmayan ve salin ile tedavi edilen kontrol grubu

Grup 2 (n=14): Hiperoksi uygulanarak APC verilen grup

Grup 3 (n=14): Hiperoksi uygulanarak salin verilen grup

3.1.2 İlaçların uygulanması

Uygun intraperitoneal doz, daha önce yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlenmiştir. Aktive protein C 0,2mg/kg/gün tek doz intraperitoneyal olarak 3-13. günler arasında uygulanmıştır. Plasebo olarak, intraperitoneal yolla tek doz % 0.9'luk salin 0.2 cc/gün uygulanmıştır (54).

3.2 Doku hazırlığı

Postnatal 14. günde her gruptaki ratların yarısının akciğer dokusu histopatolojik çalışma için torakotomi ile çıkarılarak fikse edilip bir gece %10'luk formalin içinde bırakıldı. Fikse edilmiş akciğer dokusunun her bir lobu ayrı ayrı kasetlere konup doku

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

Her üç gruptaki ratların 7'şer tanesi pentobarbital anestezisi altında sakrifiye edilerek akciğer dokuları kuru buz içerisine alındı ve sitokin ekspresyonlarının değerlendirileceği güne kadar -80 C'de saklandı.

3.3 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi

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

3.4 Alveolar alanın morfometrik ölçümü

Alveolar alan, bilgisayarlı dijital histokimyasal görüntü analizi yöntemi ile akciğer 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. Her sıçanda, 10 adet büyük büyütme görüntüsü seçildi ve dijital hale getirildi. Görüntülerin büyük arteriyel, bronşiyoler veya bronşiyel yapılar içermesi durumunda, Paintbrush programı (Microsoft) kullanılarak ölçüm dışı bırakıldı.

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

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 rehydrate 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 dehydrate 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 Sitokin ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Ekspresyonların değerlendirilmesi için dokular 1mL buzlu soğuk PBS (pH 7,2) solusyonu ile 12000 cg ve 4 C'de 20 dakika santrifüje edilerek homojenize edildi. Sitokin içerikleri pg sitokin/mg total protein olacak şekilde belirlendi. Biosource firmasının rat için üretilen Luminex multipleks sitokin kiti kullanılarak IL-1 β , IL-6, TNF- α sitokinlerinin tayini yapıldı (Nivelles, Belgium) (55).

3.7 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. Bulgular

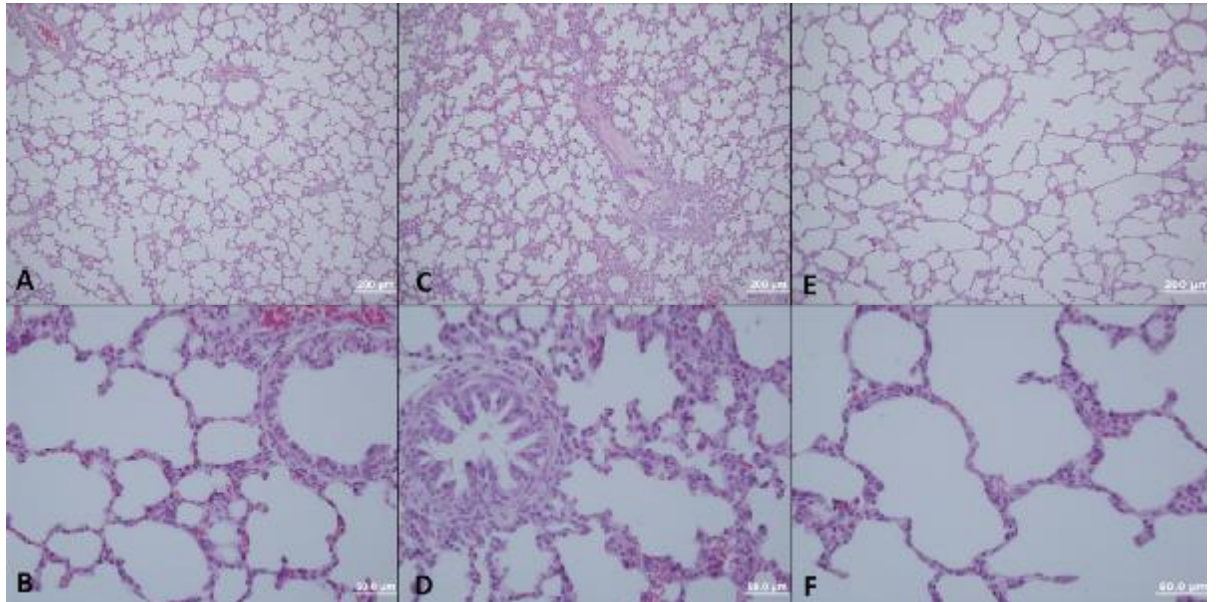
4.1 Alveoler yüzey alanı ölçümü

Çalışma gruplarının akciğer morfolojileri Şekil 1’de, ortalama alveol yüzey alanı değerleri tablo 4’te belirtilmiştir. Oda havasında bırakılan ratlarla karşılaştırıldığında hiperoksi uygulanan grupta alveolar yüzey alanının istatistiksel anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Aktive protein C tedavisi alan sıçanların alveol alanları, salin grubundaki sıçanların alveol alanlarından geniş bulunmuştur. Kontrol grubu ile APC tedavi grubunun alveol alanları açısından istatistiksel fark saptanmamıştır.

Tablo 4: Gruplara göre ortalama alveol alanı değerleri

Grup	Ortalama Alveol Alanı
1. Kontrol	156. 20±9. 8
2. Hiperoksi ve APC	149. 20±8. 9
3. Hiperoksi ve Salin	116. 77±14. 9
p değerleri	
1 – 3	0.001
1 – 2	n.s.
2 – 3	0.009

Şekil 1: Çalışma gruplarının akciğer morfolojileri (A ve B: Kontrol, C ve D: Hiperoksi ve Salin, E ve F: Hiperoksi ve APC)



4.2 Fibrozisin histolojik değerlendirmesi ve immünohistokimyasal SMA boyaması

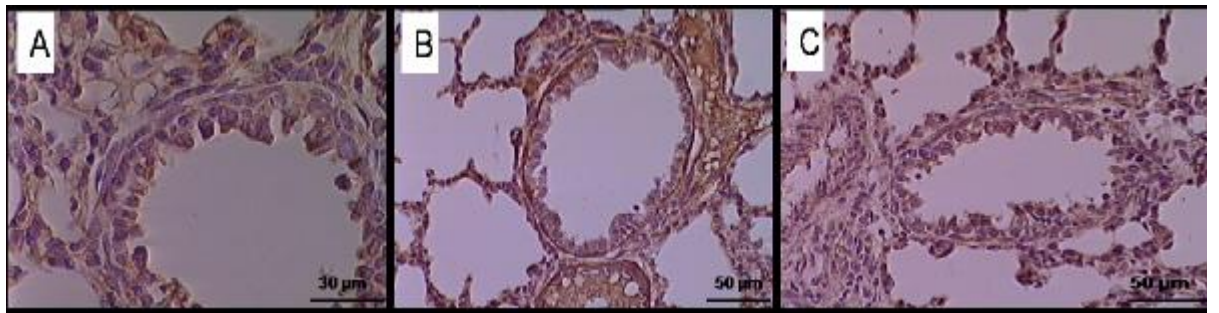
Tüm grupların fibrozis skorları tabloda belirtilmiştir (Tablo 5). Fibrozis, hiperoksiye maruz kalıp plasebo tedavi alan sıçanlarda oda havasında kalanlara göre anlamlı olarak fazla bulundu ($p=0.007$). Fibrozis, hiperoksi+APC tedavisi uygulanan yedi sıçanın dördünde saptanmazken, geri kalanında hafif ve orta şiddette idi. Bu sonuçlar, oda havası grubundaki sıçanların değerlerinden farklı bulunmazken, salin grubuna olan üstünlük istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla, $p= >0.05$, $p=0.04$).

Tablo 5: Deney gruplarında fibrozis skorlarına göre dağılım

Grup	Fibrozis			
	Yok	Hafif	Orta	Ağır
1. Kontrol	6	1	0	0
2. Hiperoksi ve APC	4	2	1	0
3. Hiperoksi ve salin	0	2	4	1
P değerleri				
1 – 2	n.s.			
1 – 3	0.007			
2 – 3	0.04			

Düz kas antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, hiperoksiye maruz kalan grupta akciğerlerde artmış düz kas içeriği olduğu görüldü. Tablo 6'da aktin skorlarının gruplara göre dağılımı sunulmaktadır. Hiperoksi+salin grubunda ortalama aktin skorlarının, oda havasına maruz kalan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p=0.004$). APC tedavisinin düz kas içeriği açısından, saline üstün olduğu saptandı ($p=0.004$) (şekil 2).

Şekil 2: Grupların Aktin Boyamaları (A: Kontrol, B: Hiperoksi ve Salin, C: Hiperoksi ve APC)



Tablo 6: Gruplara göre aktin skorları

Grup	Aktin skoru, Ortanca (Minimum – Maksimum)
1. Kontrol	2 (1-4)
2. Hiperoksi ve APC	1.5 (0-6)
3. Hiperoksi ve Salin	7 (2-12)
p değerleri	
1 – 2	n.s.
1 – 3	0.004
2 – 3	0.004

4.3 Sitokin Ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Sitokin düzeyleri hiperoksi grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aktive protein C tedavisi hiperoksinin uyardığı IL-1 β , TNF- α , ve IL-6 artışını istatistiksel anlamlı olarak azaltmıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Gruplara göre sitokin ekspresyonları

Grup	Sitokin düzeyleri (pg/mg protein)		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α
1. Kontrol	13.6 \pm 3.9	19.5 \pm 0.09	8.3 \pm 1.5
2. Hiperoksi ve APC	19.14 \pm 6.05	19.5 \pm 0.09	18.97 \pm 6
3. Hiperoksi ve salin	35.6 \pm 19.9	25.5 \pm 15.5	27.6 \pm 4.3
p değerleri			
1 – 2	n.s	n.s.	0.04
1 – 3	0.007	0.04	0.003
2 – 3	0.02	0.04	0.02

5. Tartışma

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

Bronkopolmoner displazinin gelişim mekanizmalarını anlayabilmek için pek çok hayvan modeli geliştirilmiştir. Hiperoksinin neden olduğu alveologenezis duraklamasında rol oynayan hücrel ve moleküler değişiklikler yirmi yıldan daha fazla süredir araştırılmaktadır. Alveolarizasyonun postnatal 4 ile 20. günler arasında tamamlandığı, (56). 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 (26). Oksijene maruz kalma süresi ve yoğunluğu ile uyumlu olarak akciğer endotel ve epitel hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz gelişmektedir (57). Hiperoksi distal havayollarında dallanmayı baskılayarak, gelişimin duraklamasına neden olmaktadır (27). Hiperoksi maruziyetinin özellikle nötrofillerin aktivasyonuna yol açtığı ve bu yolla endotel ve epitel hücre hasarına neden olduğu (58), TGF- α (59) düzeylerini arttırdığı, hücre çekirdeğinde inflamasyon, koagülasyon, fibrinoliz ve hücre siklusu genleri üzerinde etkili olduğu (60), endotelin-1 düzeylerinin arttırdığı (61) yakın dönemde gösterilmiş mekanizmalar arasında yer almaktadır.

Serin proteaz olan trombin koagülasyon kaskadında önemli role sahiptir. Koagülan özelliklerinin yanı sıra fibroblast kemotaksisini uyarır, hücre dışı matris komponentlerinin, fibrojenik mediyatörler olan platelet derived growth factor (PDGF) ve TGF- β 1 sentez ve proliferasyonunu uyarır. Respiratuvar distres sendromlu infantlarda damarda kan pıhtılaşmasının aktive olduğu, aktivasyonun derecesi ile RDS'nın ağırlığı arasında korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. BPD olan ve olmayan infantların bronkoalveolar yıkama sıvıları karşılaştırıldığında, BPD'li infantlarda trombin major fibroblast mitojeni olarak saptanmıştır (62). 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, APC tedavisinin alveolar alan, fibrozis, düz kas

hiperplazisi/oluşumu ve sitokin ekspresyonları üzerine olan etkinliği araştırılmış, APC'nin BPD'de pek çok patofizyolojik süreci etkileyebilecek bir tedavi şekli olduğu görülmüştür.

Aktive protein C antiinflamatuvar, antiapoptotik ve sitoprotektif özellikleri de olan fizyolojik antikoagülandır. Daha önce yapılmış deneysel çalışmalarda sepsis modellerinde, spinal kanal, beyin, böbrek, akciğer hasarlanmalarında ve romatoid artritte doku hasarlanmasını azaltıcı etkinliği gösterilmiştir. Mevcut etki mekanizmaları nedeniyle rekombinan APC ağır sepsis, septik şok ve sepsisin tetiklediği ARDS vakalarında klinik kullanılmaya girmiştir.

Deneysel çalışmalarda APC tedavisinin septik akciğer hasarlanma ve inflamasyon modelinde alveolar geçirgenliği azalttığı ve bronkoalveolar lavaj sıvısındaki inflamasyon artışını düzelttiği gösterilmiş, diğer yandan çift kör, plasebo kontrollü endotoksin aracılı akciğer hasarı oluşturulan insanlarda akciğer inflamasyonunu ve alveoler lökosit infiltrasyonunu azalttığı saptanmıştır. Bizim çalışma sonuçlarımız APC tedavisinin benzer antiinflamatuvar mekanizmalar ile hiperoksik akciğer hasarında etkin sitoprotektif ajan olabileceğini göstermiştir. Aktive protein C- EPCR kompleksi PAR-1 ile bağlandığında G_i proteinini aktive eder, protektif özelliklerini bu araçlar ile gösterir (5). Hücre yüzeyinde epidermal growth faktör reseptör ekspresyonunu artırır, nükleer faktör p50 ve p52 alt gruplarının ekspresyonunu azaltarak TNF-alfa, adezyon molekül 1, vasküler hücre adezyon-1 ve E-selektin gibi sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerini inhibe eder, ayrıca Bcl-2'nin uyarılması ve Bax, Caspase3 ve 8 aktivitesinin baskılanması ve sifingozini sifingozin-1 fosfata dönüştürerek endotelial bariyer bütünlüğünü sağlayarak apoptozisi de önlediği saptanmıştır (7).

Sunulan çalışmada, hiperoksi ve APC tedavisi birlikte 3. günde eş zamanlı olarak başlanmış, APC ile tedavi edilen sıçanların alveol yüzey alanları, SMA skorları, fibrozis dereceleri plasebo grubundan daha iyi bulunmuştur. İntersitisyel akciğer hastalığı ve akciğer hasarlanması olan hastalarda fibrinolitik sistemde defekt sonucu fibrin depolanması olduğu gösterilmiş, bleomisin aracılı akciğer fibrozisinde bronkoalveolar lavaj sıvısında inflamatuvar sitokinlerin artışı ile beraber olarak APC düzeylerinin ve fibrinolitik aktivitenin azaldığı saptanmıştır (5). Fibrin yükü fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve akciğer fibrozisi ile ilişkili bulunmuştur. Protein S ve APC, faktör Va ve VIIa'yı bağlayıp ayrıca promatriks metalloproteazları aktive edip hücre dışı matriks oluşumunu baskılayarak fibrin depolanmasını engellemektedir (62).

Bronkopulmoner displazi modellerinde APC düzeylerini araştıran çalışma bulunmamakla beraber APC, fibrin oluşumunu azalttığı ve fibrinolizisi aktive ettiği için BPD modelinde etkin tedavi modelitesi olabilir.

Bu alışma hiperoksi modelinde APC tedavisinin antienflamatuvar etkinliğinin gösterildiği ilk çalışmadır. Biz APC'nin enflamatuvar sitokin ekspresyonunu azaltarak alveolar hasarlanmayı önlediğini ve protektif özellik gösterdiğini dşunmekteyiz. Pulmoner sitokin düzeylerini tüm gruplarda 14. günde çalıştık ve plasebo grubunda 14. günde sitokin düzeylerinin yüksek olarak devam ederken tedavi grubunda sitokin düzeylerinin neredeyse kontrol grubuna benzer değerlerde olduğunu saptadık. Erişkin sıçanlarda APC'nin farklı hasarlandırıcı mekanizmalarla olan enflamatuvar yanıtı baskıladığı saptanmış, tüm invitro ve invivo çalışmalarda APC'nin endotoksin ilişkili hücre ölümü ve doku hasarı ile beraber sistemik değişiklikleri hemodinamik, enflamatuvar ve koagülatif etkileri ile geri çevirdiği gösterilmiştir (63, 64). Antikoagülan özelliklerinden bağımsız olarak farklı hücre tiplerinde endotelial ve monositler zerindeki EPCR aracılığıyla antienflamatuvar özellik gösterdiği de kanıtlanmıştır. Endotoksin hasarından korunmak ve hemostatik dengeyi sağlamak için EPCR'nn hücre yüzeyindeki ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (65). Bizim alışmamızda APC'nin antienflamatuvar etkilerini sağlayan hücresel hedefler çalışılmamıştır ancak APC'nin proenflamatuvar sitokinlerin monositler, makrofajlar ve hatta mide mukoza hücrelerinden sentez ve salınımını baskıladığı bilinmektedir (66-68). Lipopolisakkarit ile uyarılmış monositlerde APC TNF-alfa üretimini hem NF-kappaB hem de aktivator protein-1 aktivasyonunu engelleyerek baskılamaktadır (69, 70).

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 (1-4). Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlarda, farklı patofizyolojik süreçlerde rolü olan APC tedavisi uygulandığında, ortalama alveol alanı değerleri, oda havasına maruz bırakılan sıçanlara çok yakın ve hiperoksiye maruz kalıp plasebo uygulanan sıçanlardan ise istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptandı. Fibrozis, APC tedavi grubunda 7 sıçandan sadece 3'nde ve hafif-orta şiddette görüldü. Bununla birlikte, APC tedavisinin düz kas artışında plaseboya göre daha üstün koruyucu etkisi olduğu görüldü. Sitokin ekspresyonları açısından karşılaştırıldıklarında APC tedavi grubunun koruyucu etkilerini antienflamatuvar etkileri aracılığıyla gösterdiği

görüldü. Sonuç olarak, APC 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, farklı etki mekanizmaları ile APC kullanımının başarılı olabileceğini göstermektedir.

6. Sonuçlar

1. Hiperoksik akciğer hasarında akciğerlerde alveol yüzey alanının azaldığı, fibrotik değişikliklerin meydana geldiği, düz kas içeriğinin arttığı ve sitokin ekspresyonunun arttığı görüldü.
2. Aktive protein C tedavisinin, alveolar yüzey alanı, fibrozisi, düz kas içeriği ve sitokin düzeyleri kriterlerine göre plasebo tedaviden üstün olduğu saptandı.

7. Referanslar

1. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006; 367: 1421-1431.
2. D'Angio CT, Maniscalco WM. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Paediatr Drugs* 2004; 6: 303-330.
3. Bancalari E, Claure N. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:164-170.
4. Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest* 2003; 124; 26-32.
5. Suzuki K, Gabazza EC, Hayashi T, Kamada H, Adachi Y, Taguchi O. Protective role of activated protein C in lung and airway remodeling. *Crit Care Med* 2004; 32: 262-265.
6. Esmon, C.T. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit. Care Med*. 2004; 32: 298–301.
7. Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, et al. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res* 1999; 46: 566–575.
8. Northway WH. Bronchopulmonary Dysplasia: Thirty-Three Years Later, *Pediatric Pulmonology* 2001; 25: 235-7.
9. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723–1729.
10. Bland RD. Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biology of the Neonate* 2005; 88: 181-191.
11. 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.
12. Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology* 2003; 8: 63-71.
13. Duman N, Kumral A, Gülcan H, Özkan H. Outcome of very-low-birth-weight infants in a developing country: A prospective study from the west region of Turkey, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2003; 13: 54-8.

14. Gülcan H, Üzüm İ, Aslan S, Yolođlu S. İnönü Üniversitesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen çok düşük doğum ağırlıklı preterm olgularımızın değerlendirilmesi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi 2004; 11: 19-23.
15. Atasay B., Günlemez A., Ünal S., Arsan S., Outcomes of very low birth weight infants in a newborn tertiary center in Turkey, 1997-2000. The Turkish Journal of Pediatrics 2003; 45: 283-289.
16. Koksall N, Bayram Y, Baytan B. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde mekanı ventilasyon tedavisi gören yenidoğanların retrospektif değerlendirmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi 2002; 28: 1-4.
17. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia, Seminars in Neonatology 2003; 8: 73-81.
18. Groenman F, Ungre S, Post M. The molecular basis for abnormal human lung development. Biology of the Neonate 2005; 87: 164-177.
19. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia, Seminars in Perinatology 2006; 30: 179-184.
20. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. Biology of the Neonate 2001; 79: 205-9.
21. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition 1995; 73: 1-3.
22. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. Pediatric Pulmonology 1995; 19: 371-378.
23. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition 2006; 91: 132-5.
24. Chess PR, D'angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. Seminars in Perinatology 2006; 30: 171-178.
25. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. Toxicology and Applied Pharmacology 2002; 181: 60-7.
26. Atar MA, Donn SM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. Seminars in Neonatology 2002; 7: 353-360.
27. Dieperink HI, Blackwell TS, Prince LS. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme, Pediatric Research 2006; 59: 185-190.
28. Sweet DG, Halliday HL, Warner JA. Airway remodelling in chronic lung disease of prematurity. Paediatric Respiratory Reviews 2002; 3: 140-6.

29. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Seminars in Neonatology* 2003; 8: 18-27.
30. Kazzi SN, Quasney MW. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme is associated with increased risk and severity of bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Pediatrics* 2005; 147: 818-22.
31. Rojas MA, Gonzales A, Bancalari E, Claure N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *Journal of Pediatrics* 1995; 126: 605-610.
32. Hislop AA. Bronchopulmonary dysplasia: prenatal and postnatal influences. *Pediatric Pulmonology* 2001; 23: 107-109.
33. Rossi UG, Owens CM. The radiology of chronic lung disease, *Archives of Disease in Childhood* 2005; 90: 601-7.
34. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW Moderately early (7-14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 1. Art. No: CD001144.
35. Pantalitschka T, Poets CF. Inhaled drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41: 703–8.
36. Van Marter LJ. Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. *Current Opinion in Pediatrics* 2005; 17: 174-180.
37. Ozer EA, Kumral A, Ozer E, Duman N, Yilmaz O, Ozkal S, Ozkan H. Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung in the newborn rat. *Pediatric Pulmonology* 2005; 39: 35-40.
38. Christou H, Brodsky D. Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *Journal of Intensive Care Medicine* 2005; 20: 76-87.
39. Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Morgan D, Montgomery G, Grover TR, Abman SH. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005; 289: 529–535.
40. Van Haaften T, Thebaud B. Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases. *Pediatric Research* 2006; 59: 94–99.
41. Xue, M, Campbell, D, Sambrook PN, Fukudome K, Jackson C J. Endothelial protein C receptor and protease-activated receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. *J. Invest. Dermatol* 2005; 125: 1279–1285.

42. Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J. Thromb. Haemost* 2007; 5: 73–80.
43. Lay AJ, Donahue D, Tsai MJ, Castellino FJ. Acute inflammation is exacerbated in mice genetically predisposed to a severe protein C deficiency. *Blood* 2007; 109: 1984–1991.
44. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic proteinC defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 11199–11203.
45. Marti-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Coch. Database Syst. Rev* 2007; 18: CD004388.
46. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002; 296: 1880–1882.
47. Yamauchi T, Sakurai M, Abe K, Takano H, Sawa Y. Neuroprotective effects of activated protein C through induction of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 receptor, and its downstream signal phosphorylated serine-threonine kinase after spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 2006; 37: 1081–1086.
48. Fernandez JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JH. Recombinant murine-activated proteinC is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol. Dis* 2003; 30: 271–276.
49. Buisson-Legendre N, Smith S, March L, Jackson C. Elevation of activated protein C in synovial joints in rheumatoid arthritis and its correlation with matrix metalloproteinase 2. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2151–2156.
50. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat. Med* 2007; 13: 1349–1358.
51. Yuda H, Adachi Y, Tagushi O, Gabazza EC, Hataji O, Fujimoto H, et al. Activated protein C inhibits bronchial hyperresponsiveness and Th2 cytokine expression in mice. *Blood* 2004; 103: 2196–2204.
52. Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty, BW, O'Brien J, et al. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood* 2004; 104: 3878–3885.

53. Jackson CJ, Xue M, Thompson P, Davey RA, Whitmont K, Smith S, et al. Activated protein C prevents inflammation yet stimulates angiogenesis to promote cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 284–294.
54. Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res.* 2008; 1210: 56-62.
55. Heijmans C, Wesseldijk F, Munnikes R, Huygen F, Meijden P, Hop W, et al. Multiplex Bead Array Assay for Detection of 25 Soluble Cytokines in Blister Fluid of Patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Mediators Inflamm.* 2006; 1: 28398.
56. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Research* 2005; 57: 38-46.
57. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 1010: 405-416.
58. Sue RD, Belperio JA, Burdick MD, Murray LA, Xue YY, Dy MC, et al. CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 3860–3868.
59. 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, *Experimental Lung Research* 2002; 28: 361-72.
60. Wagenaar GT, Ter Horst SA, Van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, Van der Velden A, et al. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress, *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36: 782 – 801.
61. 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, *Respiratory Research* 2006; 7: 45-51.
62. Dik WA, Zimmermann LJI, Ne haber BA, Janssen DJ, H.L.C. van Kaam A, Versnel MA. Thrombin Contributes to Bronchoalveolar Lavage Fluid Mitogenicity in Lung Disease of the Premature Infant. *Pediatric Pulmonology* 2003; 35: 34–41.
63. Kohmura Y, Kirikae T, Kirikae F, Nakano M, Sato I. Lipopolysaccharide (LPS)-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 897-904.

64. Wong SS, Sun NN, Hyde JD, Ruiz L, Meigs E, Herrin BR, et al. Drotrecogin alfa (activated) prevents smoke-induced increases in pulmonary microvascular permeability and proinflammatory cytokine IL-1beta in rats. *Lung* 2004; 182: 319-330.
65. Polack B, Pernod G, Barro C, Doussiere J. Role of oxygen radicals in tissue factor induction by endotoxin in blood monocytes. *Haemostasis* 1997; 27: 193-200.
66. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Shirahama A, Ida Y. Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med* 2005; 33: 368-372.
67. Oka S, Gabazza EC, Taguchi Y, Yamaguchi M, Nakashima S, Suzuki K, et al. Role of activated protein C in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Infect Immun* 2000; 68: 2863-2869.
68. Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, Weiler HM, Liebe V, Lang S, et al. Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine* 2004; 26: 106-113.
69. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000; 110: 130-4.
70. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 2002; 88: 267-73.