

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**HİPEROKSİK AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
RATLARDA VİTAMİN D’NİN ETKİSİ**

Proje No: TSA-2014-5406

Proje Türü: N. Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Mehmet KÖSE
Tıp Fakültesi/Pediyatri AD

Araştırmacının Adı Soyadı
Doç. Dr. M. Fatih Sönmez Tıp Fakültesi/Histoloji
Dr. Osman Baştuğ Tıp Fakültesi/Yenidoğan
Yrd. Doç. Sedat Per Biyoloji/Bozok Üniversitesi
Prof. Dr. M. Adnan Öztürk Tıp Fakültesi/Yenidoğan

Şubat 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma ERCİYES Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. MATERYAL VE METOD	4
3. BULGULAR	10
4. SONUÇ	13

ÖZET

Bronkopulmoner displazi premature infantlarda en önemli sağlık problemlerindendir. Vitamin D sadece kalsiyum homeostazisinde değil aynı zamanda akciğer gelişiminde de rolü vardır. Prematüre infantlarda vitamin D eksikliğine predispozisyon vardır. Bu nedenle hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda vitamin D tedavisinin etkisini incelemeyi amaçladık

Metod: doğumdan sonraki 12-24. saatte ratlar çalışmaya alındı. Yeni doğan ratlar randomize olarak 8 gruba ayrıldı. Normoksi kontrol grubu (NC), normoksi ve vitamin D grubu (ND1, 1ng/gr/gün vitamin D), normoksi ve vitamin D grubu (ND2, 3ng/gr/gün vitamin D), normoksi ve vitamin D grubu (ND3, 5ng/gr/gün vitamin D), hiperoksi kontrol grubu (HC), hiperoksi ve vitamin D grubu (HD1, 1ng/gr/gün vitamin D), hiperoksi ve vitamin D grubu (HD2, 3ng/gr/gün vitamin D), hiperoksi ve vitamin D grubu (HD3, 5ng/gr/gün vitamin D), vitamin D2nin histopatolojik etkileri apoptozis indeksi, PCNA indeksi ve alveolar yüzey alanı (MLI metodu) ölçümü ile değerlendirildi.

Bulgular: HD1, HD2 ve HD3 grubunda MLI değerleri ve apoptotik indeks HC grubuna göre istatistiki olarak daha güzeldi($p<0.05$). PCNA pozitif hücre indeksi HD1 grubunda istatistiki olarak değişmesede HD2 ve HD3 grubunda HC grubuna göre istatistiki olarak artış gözlemlendi.

Sonuçlar: Vitamin D tedavisi hiperoksik akciğer hastalığında düzelmeye neden olmaktadır.

Anahtar kelimeler: vitamin D, hiperoksik akciğer hasarı, yenidoğan rat

ABSTRACT

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a major health problem in premature infants. Vitamin D has a role not only in calcium homeostasis but also in lung development. There is predisposition of Vitamin D deficiency in premature infants. Thus we aimed to investigate the effect of vitamin D on hyperoxia-induced lung injury in newborn rats.

Methods: Full term rat pups were included in the study 12-24 hours after delivery. The pups were randomly divided into eight groups as follows: normoxia control group (NC), normoxia plus Vitamin D group (ND1, 1ng/gr/day vitamin D), normoxia plus Vitamin D group (ND2, 3ng/gr/day vitamin D), normoxia plus Vitamin D group (ND3, 5ng/gr/day vitamin D), hyperoxia control group (HC), hyperoxia plus Vitamin D group (HD1, 1ng/gr/day vitamin D), hyperoxia plus Vitamin D group (HD2, 3ng/gr/day vitamin D), hyperoxia plus Vitamin D group (HD3, 5ng/gr/day vitamin D). The histopathological effects of vitamin D were assessed by alveolar surface area (with MLI method), apoptosis index and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index.

Results: MLI values were significantly better among 3 groups (HD1, HD2 and HD3) when compared with hyperoxia control group ($p<0.05$). Apoptotic cell index were significantly better among 3 treatment groups (HD1, HD2 and HD3) when compared with hyperoxia control group ($p<0.05$). Although PCNA positive cell index did not change in HD1 group ($p>0.05$), there were significant increases in HD2 and HD3 groups when compared with hyperoxia control group ($p<0.05$).

Conclusion: vitamin D seems to protect hyperoxia-induced lung injury in newborn rats.

Key-words: vitamin D, hyperoxia-induced lung injury, newborn rats

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyin sonunda sıçanlar intraperitoneal ketamin anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyondan sonra akciğer dokuları hızlıca çıkarıldı. Dokuların bir kısmı %10'luk nötral formalin içinde 24 saat fikse edildi. Tespit edilen dokular musluk suyunda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5–6 µm kalınlığında kesitler normal yapıyı değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin ve apoptozisi göstermek için TUNEL yöntemi ve hücre proliferasyonunu görmek için de PCNA ile immun boyandı ve Olympus BX–51 fotomikroskopla incelenerek fotoğraflar elde edildi. Dokuların geri kalan kısımları -80 °C'de ELISA çalışmaları saklandı.

Histomorfometri

Histomorfometride alveolar büyüklükleri, yani mean linear intercept, ölçmek için daha önce tanımlanmış olan (referans) metoda göre ölçüm yapıldı. Bunun için her bir denekten alınan akciğer örneklerinden 400X'de fotoğraflar çekildi. Çekilen fotoğraflara Image J programında, ekranı 10 eşit parçaya bölecek şekilde 9 adet grid atıldı ve sayıma başlandı. Sayım sırasında kan damarları, bronşlor ve bronşlioller sayım dışı bırakıldı. Fakat bu yapılarla temas halinde olan veya kesişen alveolar yüzeyler ve kesişmeyen alveolar yüzeyler sayıldı. Sayım yapılırken daha önce tanımlanan $Lm = (N \times L)/m$ formüle göre hesaplama yapıldı. ***Lm***; mean linear intercept, ***N***; değerlendirilen alan sayısı, ***L***; çizgilerin uzunlukları ve ***m***; kesişen tüm noktaların toplam sayısı.

TUNEL Yöntemi

Akciğer dokusundaki apoptozisi göstermek için TUNEL yöntemi kullanıldı. Bunun için Roche firmasından alınan “*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein” kiti kullanıldı ve boyama işlemi, kitin prosedürüne göre yapıldı. Kısaca özetleyecek olursak, 5-6 µm kalınlığında alınan akciğer dokuları deparafinize ve ardından rehidrate edildikten sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda

mikrodalga fırında 350 W'de 5 dakika bekletildi ardından oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokular daha sonra kitin içinden çıkan TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 °C'de nemli ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokulara DAPI ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan dokular Olympus BX-51 floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda görüntülendi.

Dokulardaki apoptotik hücreler sayılarak apoptotik indeks oluşturuldu. Apoptotik indeks için her bir kesitten 40X büyütmede 10 farklı alandan görüntüler alındı. Bu alanlardaki apoptotik hücreler sayılarak apoptotik indeks oluşturuldu.

İmmunohistokimya

Akciğer dokusunda oluşan PCNA ekspresyonundaki farklılıkları belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle işaretleme yapıldı. Bunun için alınan 5-6 µm lik kesitler bir gece 60°C'de tutuldu, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi, daha sonra fosfat tampon (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılan kesitler, 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi ve sonraki aşamalar için ABC staining system (*Santa Cruz, sc-2023*) boyama kiti kullanılacak. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler PCNA (*sc 9857*) için primer antikoru ile 1 gece +4°C'de bekletildi ve ertesi gün 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra Avidin-Biotin

(AB) enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteleri görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği su ile yıkandı. Gill hematoxilen ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyonize su ile yıkandı. Son aşama olarak artan alkol serileri ile su uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı. Olympus BX51 model ışık mikroskobu altında DP71 model dijital fotoğraf makinesi ile görüntüler elde edildi. Her bir denekten beş farklı alandan elde edilen görüntülerden, Image J programında PCNA pozitif hücreler sayılarak tüm hücrelere oranlandı ve gruplar arasındaki farklılık ortaya konuldu.

ELISA

ELISA analizleri için alınan akciğer dokuları -80 °C'de analizler yapılincaya kadar saklandı. Analizlerin yapılacağı zaman oda sıcaklığına çıkarılan dokular 15 dakika ısınmaya bırakıldı. Daha sonra buz üzerinde ELISA kitlerinin prosedürüne uygun olacak şekilde homojenize edildi. Homojenize edilen akciğer dokuları +4 °C'de 30 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatantları alınıp alikotlanarak ELISA işlemlerine hazır hale getirildi. IGF-1 (Cloud-Clone Corp., SEA050Ra), IL-10 (MyBioSource, MBS2503826), MMP-9 (MyBioSource, MBS2503128), TNF- α (Invitrogen, KRC3011), IFN- γ (Thermo Scientific, ERIFNG), MDA(SenRedBio, 201-11-0157) ve VEGF (SunRedBio, 201-11-0660) ELISA kitleri kullanılarak akciğer doku homojenatlarında miktarları belirlendi

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

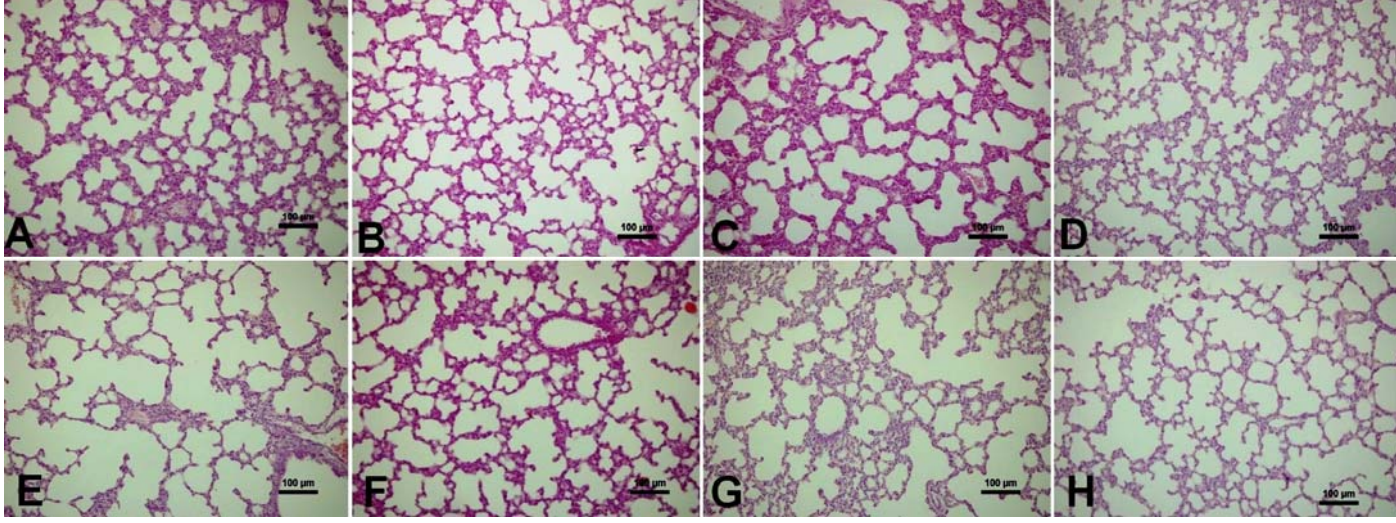
Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılım programında yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. Tüm parametrelere ait sonuçlar one way ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. Post hoc analiz için Tukey Testi kullanıldı. İstatistiksel analiz $p < 0.05$ olarak değerlendirildi

BULGULAR

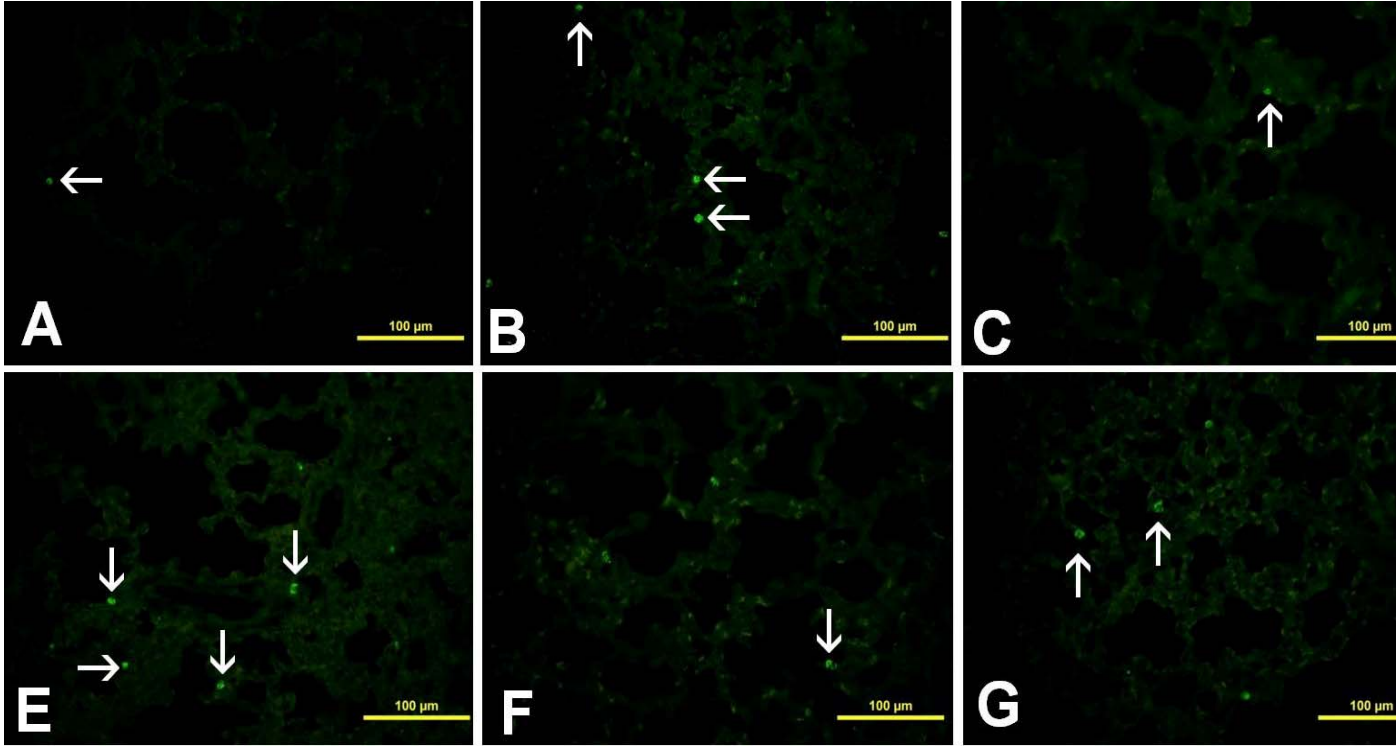
Akciğer kesitlerindeki MLI, apoptotik hücre ve PCNA pozitif hücre indeksi Tablo 1’de gösterilmektedir. Histolojik inceleme sonucunda hiperoksi grubundaki MLI değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Tedavi amaçlı verilen D vitamini gruplarında da MLI değerlerinin iyileştiği gözlemlendi. Bütün gruplara ait histolojik görüntüler Şekil 1’de gösterilmektedir.

Akciğer kesitlerinde apoptozisi belirlemek için TUNEL yöntemi, hücre proliferasyonunu göstermek için ise PCNA immunohistokimyası yapıldı. Hiperoksi grubunda apoptotik indeksin kontrol grubuna göre arttığı, PCNA pozitif hücre sayısının ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Tedavi amaçlı verilen D vitamininin tüm dozlarının apoptotik hücre sayısında iyileşme sağladığı gözlemlendi. Ancak hiperoksi grubuna tedavi amaçlı verilen D vitamini dozlarından Hd grubu PCNA indeksinde iyileşme sağlanmazken Hd3 ve Hd5 gruplarına istatistiksel olarak anlamlı iyileşme belirlendi.

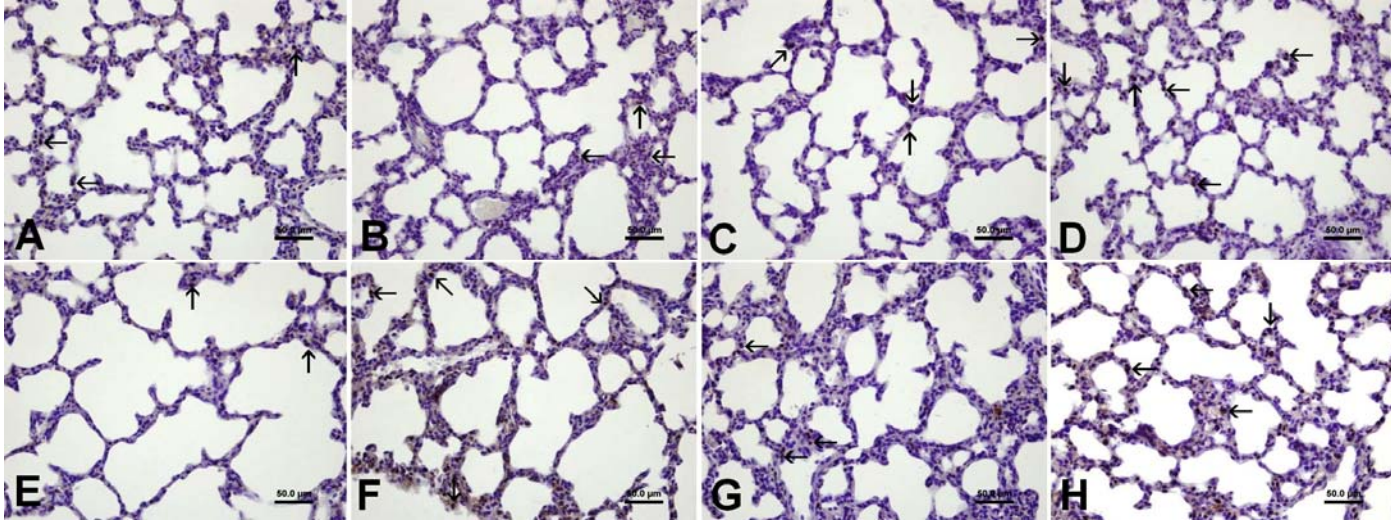
Hiperoksinin akciğer dokusunda oluşturduğu hasarı belirlemek için IGF-1, IL-10, MMP-9, TNF- α , IF- γ , MDA ve VEGF ELISA kitleri ile çalışıldı (Tablo 2). Hiperoksi sonucunda IGF-1, MDA ve VEGF değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı, IL-10, MMP-9, TNF- α ve IF- γ , değerlerinin ise kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi. Bu parametrelerden sadece MMP-9 istatistiksel olarak anlamlı olarak değişti, diğer değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tedavi amaçlı verilen D vitamininin ELISA parametrelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede değiştirmedikleri gözlemlendi.



Şekil 1. Farklı gruplara ait akciğer kesitleri görülmekte. **(A)** NK. **(B)** ND. **(C)** ND3 **(D)** ND5 **(E)** HK **(F)** HD **(G)** HD3 **(H)** HD5 . (H&E, skala bar: 100µm)



Şekil 2. Akciğer kesitlerinde bulunan TUNEL pozitif hücreler ayırt edilmekte. Apoptotik hücre çekirdekleri (ok) yeşil floresan sergilemekte. **(A)** NK. **(B)** ND. **(C)** ND3 **(D)** ND5 **(E)** HK **(F)** HD **(G)** HD3 **(H)** HD5



Şekil 3. Akciğer kesitlerinde bulunan PCNA pozitif hücreler (ok) ayırt edilmekte. Deney gruplarındaki PCNA pozitif hücre sayısının kontrole göre azaldığı dikkati çekmektedir. (A) NK. (B) ND. (C). ND3 (D) ND5 (E) HK (F) HD (G) HD3 (H) HD5

Tablo 1. Akciğer dokusundaki MLI, apoptotik indeks ve PCNA indeksi gösterilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

	MLI (μm)	PCNA indeksi	Apoptotik indeks	
Nk	71.33 $\pm$ 1.53	0.230 $\pm$ 0.016	1.298 $\pm$ 0.175	
Nd	70.37 $\pm$ 1.91	0.186 $\pm$ 0.013	1.018 $\pm$ 0.143	
Nd3	68.70 $\pm$ 0.93	0.318 $\pm$ 0.015*	0.391 $\pm$ 0.084*	
Nd5	68.19 $\pm$ 1.56	0.326 $\pm$ 0.019*	0.353 $\pm$ 0.070*	
Hk	92.98 $\pm$ 2.09*	0.142 $\pm$ 0.010*	2.500 $\pm$ 0.263*	
Hd	83.93 $\pm$ 1.95* ^b	0.132 $\pm$ 0.008*	1.455 $\pm$ 0.153 ^b	
Hd3	81.76 $\pm$ 1.68* ^b	0.277 $\pm$ 0.026 ^b	0.575 $\pm$ 0.079* ^b	
Hd5	82.33 $\pm$ 1.87* ^b	0.266 $\pm$ 0.018 ^b	0.700 $\pm$ 0.105 ^b	

*NK ile karşılaştırıldığında P<0.05. ^b HK ile karşılaştırıldığında P<0.05

Tablo 2. Akciğer dokusundaki IGF-1, IL-10, MMP-9, TNF- α , IF- γ MDA ve VEGF düzeyleri gösterilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

	IGF-1 (pg/ml)	IL-10 (pg/mL)	MMP9 (ng/mL)	TNF-α (pg/ml)	IF-γ (pg/ml)	MDA (nmol/ml)	VEGF (ng/L)
NK	2256.08 $\pm$ 190.12	30.09 $\pm$ 1.76	3.03 $\pm$ 0.13	58.91 $\pm$ 3.00	15.48 $\pm$ 1.26	14.82 $\pm$ 3.16	504.07 $\pm$ 28.45
ND	2600.58 $\pm$ 310.44	21.32 $\pm$ 1.77	3.65 $\pm$ 0.22*	64.57 $\pm$ 4.91	22.94 $\pm$ 3.43	16.23 $\pm$ 1.50	609.10 $\pm$ 30.71
ND 3	2293.24 $\pm$ 221.94	21.44 $\pm$ 3.51	2.50 $\pm$ 0.09*	45.27 $\pm$ 1.74	12.95 $\pm$ 2.16	17.06 $\pm$ 2.74	622.71 $\pm$ 32.84
ND 5	2211.66 $\pm$ 143.56	18.76 $\pm$ 4.46	2.54 $\pm$ 0.07*	42.05 $\pm$ 1.12*	7.38 $\pm$ 0.42	17.69 $\pm$ 1.21	672.71 $\pm$ 62.06
HK	3402.80 $\pm$ 293.91	20.66 $\pm$ 1.81	2.47 $\pm$ 0.07*	53.89 $\pm$ 4.60	14.54 $\pm$ 2.26	17.03 $\pm$ 1.94	575.26 $\pm$ 43.50
HD	2630.16 $\pm$ 286.92	14.65 $\pm$ 3.67	2.37 $\pm$ 0.03*	56.04 $\pm$ 3.21	18.64 $\pm$ 2.28	15.20 $\pm$ 2.06	524.32 $\pm$ 40.51
HD 3	4367.87 $\pm$ 431.86*	23.84 $\pm$ 2.69	2.42 $\pm$ 0.06*	52.00 $\pm$ 2.32	14.96 $\pm$ 2.48	15.73 $\pm$ 2.01	663.26 $\pm$ 27.55
HD 5	3891.58 $\pm$ 336.90*	21.37 $\pm$ 5.41	2.62 $\pm$ 0.12*	45.80 $\pm$ 2.46	12.27 $\pm$ 2.08	15.15 $\pm$ 2.71	608.44 $\pm$ 50.35
*NK ile karşılaştırıldığında P<0.05, ^b HK ile karşılaştırıldığında P<0.05							

SONUÇLAR

Vitamin D tedavisinin hiperoksik akciğer hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda akciğer dokusundaki hasarı iyileştirdiği gözlenmiştir. Özellikle bu etki doz arttıkça daha belirgin olarak gözlenmektedir.