



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI: Bronkopulmoner displazi profilaksisinde antifibrotik ve antioksidan etkileri olan Chrysin'in rolü

Proje No: TSA-2018-1384

Proje Türü: Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Uzm.Dr. Hatice TURGUT,

Tıp Fakültesi / Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD

Araştırmacılar

1. Prof.Dr. Ramazan ÖZDEMİR; Tıp Fakültesi / Pediatri ABD
2. Doç.Dr. Aslı TAŞLIDERE; Tıp Fakültesi / Histoloji ve Embriyoloji ABD
3. Dr.Öğr.Üye. İsmail Kürşad GÖKÇE; Tıp Fakültesi / Pediatri ABD
4. Prof.Dr. Süleyman SANDAL; Tıp Fakültesi / Fizyoloji ABD

04. 2020

MALATYA

Önsöz: Normal doğum zamanından erken doğan bebeklerde görülen Bronkopulmoner Displazi (BPD), ciddi bir sağlık problemidir. Bu çalışmada antioksidan, antiinflamatuvar ve antifibrotik etkili Chrysinin, BPD gelişiminin önlenmesindeki etkisi deneysel bir hayvan (rat) çalışması ile değerlendirilmesi planlandı. Bu amaçla öncelikle İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan çalışma için onay alındı. Daha sonra İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine maddi destek için başvuruda bulunuldu. Projemiz BAP birimince desteklenmesi uygun bulundu.

Bu projede maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	7
2. GEREÇ VE YÖNTEM	7
3. BULGULAR	7-8
4. TARTIŞMA/SONUÇ	8-9
5. REFERANSLAR	9-10

ÖZET:

Oksidatif stres ve inflamasyon, bronkopulmoner displazi (BPD) etiopatogenezinde çok önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, antioksidan, antiinflamatuvar ve antifibrotik bir ilaç olan Chrysin (CH), BPD üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Kırk adet yavru rat Kontrol, CH, BPD ve BPD+CH olarak dört gruba ayrıldı. Çalışmanın sonunda akciğer dokusunda apoptoz, histopatolojik hasar ve alveolar makrofaj skorları, oksidan kapasite, antioksidan kapasite ve inflamasyon değerlendirildi. BPD ve BPD+CH gruplarının ortalama histopatolojik hasar skoru ve alveolar makrofaj skorlarının kontrol ve CH gruplarından daha yüksek olduğu bulundu ($p \leq 0,0001$). Her iki skorun da BPD+CH grubunda BPD grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($p \leq 0,0001$). TUNEL ve Caspase-3 pozitif hücre yüzdesinin BPD+CH grubunda BPD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu. BPD grubunun akciğer dokusu ortalama MDA, TOS, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin, kontrol ve BPD+CH gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). BPD+CH grubunun ortalama TNF- α ve IL-1 β düzeyleri kontrol grubu ile benzer iken MDA ve TOS düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, BPD grubuna göre ise anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. BPD grubunun ortalama TAS, SOD, GSH, GSH-Px düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p < 0.05$). BPD hayvan modelinde CH profilaksisinin sonucunda düşük histopatolojik hasar skoru ve apoptoz hücrelerin yanı sıra inflamasyon ve oksidatif kapasitede azalma antioksidan kapasitede artış bulunmuştur.

Anahtar Kelime: Bronkopulmoner displazi, Kronik akciğer hastalığı, Chrysin, Hiperoksik akciğer hasarı, Yenidoğan

ABSTRACT:

Oxidative stress and inflammation play a critical role in the etiopathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD). In this study, we plan to investigate the efficacy and

response of BPD to Chrysin (CH), an antioxidant, antiinflammatory, and antifibrotic drug. Forty infant rats were divided into four groups labeled the Control, CH, BPD, and BPD+CH. At the end of the study, lung tissue was evaluated with respect to apoptosis, histopathological damage and alveolar macrophage score, oxidant capacity, antioxidant capacity, and inflammation. The BPD and BPD+CH groups exhibited higher mean scores of histopathological damage and alveolar macrophage when compared to the control and CH groups ($p \leq 0.0001$). Both scores were found to be lower in the BPD+CH group in comparison to the BPD group ($p \leq 0.0001$). The BPD+CH group demonstrated a significantly lower ratio of TUNEL and caspase-3 positive cells than the BPD group. Compared to the BPD+CH and control groups, the lung tissues of the BPD group displayed substantially higher levels of MDA, TOS, TNF- α , and IL-1 β ($p < 0.05$). While the BPD+CH group showed similar levels of TNF- α and IL-1 β as the control group, MDA and TOS levels were higher than the control group, and significantly lower than the BPD group. The BPD group exhibited considerably lower levels of TAS, SOD, GSH, and GSH-Px in comparison to the control group ($p < 0.05$). CH prophylaxis results in low histopathologic damage score and apoptosis cells as well as decrease in inflammation and oxidative capacity and increase capacity in an animal model of BPD.

Key words: Bronchopulmonary dysplasia, Chronic lung disease, Chrysin, Hyperoxic lung injury, Newborn

Giriş ve Genel Bilgiler: Bronkopulmoner displazi (BPD), inflamasyon, fibrozis ve mukozal nekroz sonucu amfizematöz alveoller ile karakterize bir hastalıktır. BPD etyopatogenezinde inflamasyon ve oksidatif stres çok önemli rol oynamaktadır. Prematüre doğumların engellenmesi, prenatal steroid tedavileri, postnatal dönemde sürfaktan, yeni mekanik

ventilasyon stratejileri, antiinflamatuvar ve antioksidanlar ajanlar BPD tedavisinde ve profilaksisinde kullanılan yöntemlerdir. Ancak BPD'nin profilaksisi ve tedavisinde, günümüzde etkinliği kesin olarak kanıtlanmış bir tedavi modeli bulunmamakta ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir (1-3).

Doğal bir flavonoid olan Chrysin (CH), güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri olan bir ajandır. Antioksidan etkileri serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneğinden kaynaklanırken, antiinflamatuvar etkilerini sitokin, nitrik oksit, prostaglandin E ve siklooksijenaz-2'yi azaltarak göstermektedir (4-8).

Bu çalışmada, antioksidan, antiinflamatuvar ve antifibrotik bir ilaç olan CH'in BPD üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya alınan 40 adet yeni doğmuş Wistar Albino türü ratlar Kontrol (n=10), CH (n=10), BPD (n=10) ve BPD+CH (n=10) olarak dört gruba ayrıldı. Kontrol ve CH grubundaki ratlar oda havasında (%21 oksijen) tutuldu. BPD ve BPD+CH gruptaki ratlar ise doğumdan itibaren çalışma boyunca oksijen konsantrasyonu %90-95 olan özel üretilmiş fanuslarda tutuldular. CH ve BPD+CH grubundaki ratlara 10 gün boyunca 20 mg/kg/gün CH, kontrol ve BPD grubundaki ratlara ise aynı miktarda distile su intraperitoneal yolla uygulandı. Çalışma sonunda ratlar derin anestezi altında dekapite edilerek akciğer dokuları çıkarıldı. Sol akciğerde; TUNEL ve Caspase-3 boyama yöntemleri ile apoptoz, histopatolojik hasar skoru ve alveolar makrofaj skoru değerlendirildi. Sağ akciğer dokusunda ise oksidan kapasite [Malondialdehid (MDA), Total oksidan status (TOS)], antioksidan kapasite [Süperoksid dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Redükte glutasyon (GSH), Total antioksidan kapasite (TAS)] ve inflamasyon [Tümör nekrozis factor- α (TNF- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β)] değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol grubu ile CH grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru ve alveolar makrofaj skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. BPD ve BPD+CH gruplarının ortalama histopatolojik hasar ve alveolar makrofaj skorlarının kontrol ve CH gruplarından anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p \leq 0,0001$). BPD+CH grubunun ortalama histopatolojik hasar ve alveolar makrofaj skorunun ise BPD grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulundu (1.77&2.31 ve 2.34&4.24, $p \leq 0,0001$; sırasıyla). TUNEL ve Caspase-3 pozitif hücre yüzdesinin BPD+CH grubunda BPD grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu.

BPD grubunun akciğer dokusu ortalama MDA, TOS, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin, kontrol ve BPD+CH gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). BPD+CH grubunun ortalama TNF- α ve IL-1 β düzeyleri kontrol grubu ile benzer iken MDA ve TOS düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek, BPD grubuna göre ise anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. BPD grubunun ortalama TAS, SOD, GSH, GSH-Px (antioksidan parametreler) düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. TAS dışındaki antioksidan parametrelerin BPD grubuna göre BPD+CH grubunda daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$).

Tartışma/Sonuç: Bu çalışma ile yenidoğan bebeklerde hayat kalitesini düşüren, ciddi ölüm ve hastalıklara sebep olan BPD gelişimin önlenmesi için antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik özelliklere sahip CH'nin etkinliği değerlendirildi.

Oksijen, hidroksil radikalleri gibi aşırı derecede reaktif ve yıkıcı radikaller oluşturarak ve membran lipidlerinin peroksidasyonu ile doku hasarına neden olmaktadır. Oksijen elektron alarak süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikallerine dönüşebilir. Serbest oksijen radikalleri hücre membranında lipid peroksidasyonuna, sülfidril enzimlerinin inaktivasyonu ile proteinlerde zedelenme ve DNA yapısında bozukluklara neden olmaktadır. BPD patogeneğinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, kompleks glutatyon-redoks enzimleri gibi antioksidan enzim sistemlerinin yetersizliği önemlidir (9, 10). Ayrıca prematüre bebeklerde doğumda antioksidan enzim sistemlerinin yetersizdir ve oksidatif stres BPD gelişiminde büyük rol oynamaktadır. Bu nedenle, antioksidan tedavilerin BPD üzerinde olumlu etkisi olabileceğini düşünülmektedir.

BPD gelişim sürecinde inflamasyon da çok önemli yere sahiptir. Son yıllarda BPD'nin gelişiminde esas rolü inflamasyonun oynadığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. İnflamatuvar mediatörlerin aktivasyonu insanda ve hayvanlarda akut akciğer zedelenmesine ve akciğer dokusunun anormal tamirine yol açmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, yüksek tidal hacim ile ventilasyon ve infeksiyon, inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (11-12).

Yaptığımız bu çalışmada hiperoksik akciğer hasarı modeli uygulanan ratlarda CH'nin akciğerlerde antioksidan enzim aktivitelerini (TAS, SOD, GSH, GSH-Px) artırdığı, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi (MDA, TOS) ve inflamasyonu (TNF- α ve IL-1 β) azalttığını saptadık. CH'ını akciğer dokusu üzerine bu olumlu etkileri sayesinde, CH alan grupta akciğer hasarlanmasının daha az (azalmış akciğer hasarı, makrofaj aktivasyonu ve apoptozis) olduğunu gösterdik.

Sonuç olarak bu çalışma; antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik bir ilaç olan chrysinin, neonatal hiperoksik akciğer hasarı modelinde BPD gelişiminde koruyucu etkinliğe sahip olduğunu literatürde gösteren ilk çalışmadır. Ancak chrysinin BPD üzerindeki yararlı etkisinin altında yatan mekanizmayı tam aydınlatmak ve gelecekte BPD'nin koruyucu tedavisinde kullanılabilmesi içinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Finansal Destek: Bu çalışma İnönü Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2018-1384.

Referanslar:

1. Arsan S, Korkmaz A, Oğuz S. Türk Neonatoloji Derneği bronkopulmoner displazi korunma ve izlem rehberi. Turk Pediatri Ars. 2018; 53(Suppl 1): 138-50.
2. Gien J, Kinsella JP. Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. Curr Opin Pediatr. 2011;23:305-13.
3. Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. Semin Neonatol. 2003;8:63-71.
4. Shen Y, Tian P, Li D, Wu Y, Wan C, ve ark. Chrysin suppresses cigarette smoke-induced airway inflammation in mice. Int J Clin Exp Med 2015;8:2001-8.
5. Yao J, Jiang M, Zhanga Y, Liu X, ve ark. Chrysin alleviates allergic inflammation and airway remodeling in a murine model of chronic asthma. International Immunopharmacology. 2016;32:24-31.
6. Kilic T, Ciftci O, Cetin A, Kahraman H. Preventive Effect of Chrysin on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. Inflammation. 2014;37:2116-24.
7. Yao J, Zhang YS, Feng GZ, Du Q. Chrysin inhibits human airway smooth muscle cells proliferation through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. Molecular Medicine Reports. 2015;12:7693-8.
8. Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, ve ark. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. Int. J. Cancer: 2007;120:2019-27.

9. Ozdemir R, Demirtas G, Parlakpinar H, Polat A, ve ark. Dexpanthenol Therapy Reduces Lung Damage in a Hyperoxic Lung Injury in Neonatal Rats. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(11):1801-7.
10. Ozdemir R, Yurttutan S, Talim B, Uysal B, ve ark. Colchicine protects against hyperoxic lung injury in newborn rats. *Neonatology* 2012;102(4):265-9.
11. Speer CP. Pre-and postnatal inflammatory mechanisms in chronic lung disease of preterm infants. *Paediatr Respir Rev* 2004;5:241-4.
12. Groneck P, Speer CP. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child* 1995;73:F1-F3.