



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Savaş KANSOY



DENEYSEL FARE MODELİNDE NÖTROFİL DÜZEYİNİN NEKROTİZAN ENTEROKOLİT GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uz. Dr. Demet TEREK

NEONATOLOJİ
YANDAL UZMANLIK TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Mete AKİSU

İZMİR- 2012

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı yandal eğitimim süresince desteğini aldığım; tecrübe, ilgi ve emeğini paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Nilgün Kültürsay'a, tez hocam sayın Prof. Dr. Mete Akisu'ya, sayın hocam Doç. Dr. Mehmet Yalaz'a,
EÜTF Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Eser Sözmen'e
EÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Meral Baka'ya
EÜTF Tıbbi İstatistik Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Mehmet Orman'a
Yandal uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım uzman arkadaşlarım Özge Altun Köroğlu, Betül Siyah Bilgin, Deniz Gönülal, Sezgin Güneş, Sema Tanrıverdi ve Özgün Uygur'a,
Yenidoğan yoğun bakımda çalışan hemşire arkadaşlarıma ve personel ekibine,
Her zaman yanımda olan sevgili eşime, biricik kızım Damla'ya, anneme ve babama,
En içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Demet Terek

Bu çalışma EÜTF Araştırma Projeleri Alt Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2012-TIP-011

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	v
TABLOLAR.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
RESİMLER.....	viii
BİRİNCİ BÖLÜM	
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
İKİNCİ BÖLÜM	
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2. Gastrointestinal sistem fizyolojisi.....	5
2.3.Nekrotizan enterokolit patogenezi.....	6
2.3.1. İmmatür bağırsak motilitesi ve sindirim.....	7
2.3.2. İmmatür bağırsak dolaşım düzenlenmesi.....	8
2.3.3. İmmatür bağırsak bariyer işlevi.....	9
2.3.3.1. Yapısal bariyer.....	9
2.3.3.2. Biyokimyasal bariyer.....	11
2.3.4. Bağırsak iskemisi.....	12
2.3.5. Konak savunma faktörleri.....	13
2.3.6. Beslenme.....	14
2.3.6.1. Amniotik sıvının rolü.....	14
2.3.6.2. Enteral ve parenteral beslenme.....	15
2.3.7. Bakteriyal kolonizasyon ve pro-inflamatuvar yanıt.....	16
2.3.8. İmmatür bağırsak edinsel immünitesi.....	19
2.3.9. Genetik yatkınlık.....	20
2.4. Klinik bulgular.....	22
2.5. Tıbbi tedavi.....	24
2.6. Cerrahi tedavi.....	24
2.7. Uzun dönem komplikasyonlar.....	25
2.8. Koruyucu stratejiler.....	26
2.9. Nekrotizan enterokolit ve oksidan hasar.....	31
2.9.1. Oksidan hasar.....	31
2.9.2. Antioksidan sistem.....	31
2.10. Nekrotizan enterokolit ve inflamatuvar sitokinler.....	34
2.11. Nekrotizan enterokolit ve toll-like reseptör (TLR).....	35
2.12. Nekrotizan enterokolit ve poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP).....	35
2.13. Nekrotizan enterokolit ve apoptoz.....	36
2.13.1. Apoptoz.....	36
2.13.2. Apoptoz ve bağırsak sistemi.....	38
2.13.3. Apoptozun TUNEL yöntemi ile gösterilmesi.....	38
2.14. Nekrotizan enterokolit ve nötrofil.....	39
2.15. Nekrotizan enterokolit ve kitotriozidaz.....	39

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3.1. Deneysel gereç	42
3.2. Deney hayvanları	42
3.3. Deney grupları.....	43
3.4. Deneysel yöntem	44
3.4.1. Nötropeni modeli	44
3.4.2. Nötrofili modeli (lökositoz)	44
3.4.3. Lökosit ve nötrofil düzeyinin saptanması.....	44
3.4.4. Nekrotizan enterokolit modeli.....	45
3.5. Işık mikroskobu doku takibi ve bloklama	48
3.6. Kesit alma	48
3.7. Histokimyasal boyamalar	49
3.7.1. Hematoksilen ve eozin boyama tekniği	49
3.7.2. Periyodik asid schiff (PAS) boyama	50
3.7.3. Mallory Azan (bağ dokusu) boyama	50
3.7.4. Sudan Black boyama.....	51
3.7.5. TUNEL boyama protokolü	51
3.7.5.1.TUNEL yöntemi ile apoptozun değerlendirilmesi.....	53
3.8. Laboratuvar göstergeleri	53
3.8.1. Bağırsak dokusu TBARS ölçümü	53
3.8.2. Miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümü	54
3.8.3. Bağırsak dokusundaki inflamatuvar sitokin ve mediatörlerin değerlendirilmesi.....	54

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR	
4.1. Histolojik bulgular	56
4.1.1. Hematoksilen eozin (HE) boyalı preparatlardan elde edilen bulgular	56
4.1.2. PAS boyalı preparatlardan elde edilen bulgular	62
4.1.3. Bağ dokusu Mallory Azan boyalı preparatlardan elde edilen bulgular ...	63
4.1.4. Sudan Black boyalı preparatlardan elde edilen bulgular	63
4.1.5. TUNEL ile boyanmış preparatlardan elde edilen bulgular	63
4.1.6. Mikroskobik hasar skorlaması	67
4.2. Demografik veriler ve serum parametreleri	68

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA	78
SONUÇLAR.....	90
KAYNAKLAR	93
TÜRKÇE ÖZET	120
İNGİLİZCE ÖZET	122
EKLER.....	124

KISALTMALAR

ATP	:	Adenozin Trifosfat
BPD	:	Bronkopulmoner Displazi
CPS-1	:	Karbamoil fosfat sentetaz 1
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
GM-CSF	:	Granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
H/R	:	Hipoksi ve reperfüzyon
HB-EGF	:	Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
HIS	:	Histolojik hasar skoru
IGF-1	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IFN-γ	:	İnterferon-gama
IL	:	İnterlökin
LPS	:	Lipopolisakkarid
LCPUFA	:	Çoklu doymamış yağ asitleri
LT	:	Lökotrien
MDA	:	Malondialdehit
MPO	:	Myeloperoksidaz enzimi
NEK	:	Nekrotizan Enterokolit
NAD⁺	:	Nikotinamid adenein dinükleotid
NF-κB	:	Nükleer Faktör Kappa B
NO	:	Nitrik oksit
PAF	:	Platelet aktive edici faktör
PARP	:	poli(ADP-riboz) polimeraz
PDA	:	Patent Duktus Arteriozus
PMN	:	Polimorf nüveli nötrofil
RDS	:	Respiratuar distres sendromu
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TBARS	:	Thiobarbituric Acid Reactive Substance
TGF	:	Transforme edici büyüme faktörü
TLR	:	Toll-like receptor
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
USG	:	Ultrasonografi
VEGF	:	Vasküler endotelial büyüme faktörü

TABLULAR

Tablo 1:	Nekrotizan enterokolit ile kendiliğinden bağırsak perforasyonu arasındaki klinik farklılıklar	5
Tablo 2:	Nekrotizan enterokolit için modifiye Bell evrelemesi.....	23
Tablo 3:	Potansiyel nekrotizan enterokolitten koruyucu stratejiler.....	26
Tablo 4:	Reaktif oksijen ürünleri ve antioksidanlar	32
Tablo 5:	Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması	36
Tablo 6:	Mikroskopik hasar skorlaması	47
Tablo 7:	Epitel dokusunda mikroskobik hasar skorlaması.....	67
Tablo 8:	Lamina propriada mikroskobik hasar skorlaması	68
Tablo 9:	Gruplar arası yavru farelerin ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirilmesi	68
Tablo 10:	Gruplar arası yavru farelerin lökosit sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi	69
Tablo 11:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu absolü nötrofil sayılarının (ANS) istatistiksel değerlendirilmesi	70
Tablo 12:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu TBARS düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	71
Tablo 13:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu MPO aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	72
Tablo 14:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu kitotriozidaz aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi	73
Tablo 15:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu IL-6 düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	74
Tablo 16:	Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu TLR4 düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	75
Tablo 17:	Hipoksi-rekoksijenizasyona uğratılmış yavru farelerde bağırsak dokusu PARP düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi	76
Tablo 18:	Gruplar arasındaki değerlendirme.....	77

ŞEKİLLER

Şekil 1: Nekrotizan enterokolit patogenezi	7
Şekil 2: Prematüre bebekte immatür bağırsak bariyer işlevleri.....	9
Şekil 3: Nekrotizan enterokolit olgularında anormal bakteriyal kolonizasyon sonuçları	17
Şekil 4: İmmatür bağırsak edinsel immünitesi	20
Şekil 5: Nekrotizan enterokolit olgularında genetik yatkınlık.....	21
Şekil 6: Serbest radikal oluşumu, hücre hasarı ve nötralizasyonu	33
Şekil 7: Hücre içi ve dışından gelen sinyallerle başlayan apoptoz aşamaları ve hücre içinde meydana gelen değişiklikler	37
Şekil 8: Nekrotizan enterokolit patogenezi ve tedavisi	41
Şekil 9: Çalışma gruplarının dağılımı	43
Şekil 10: Lökosit sayılarının gruplara göre dağılımı.....	69
Şekil 11: Gruplara göre absolü nötrofil sayılarının değişimi (ANS: Absolü nötrofil sayısı).....	70
Şekil 12: Gruplara göre TBARS düzeyleri dağılımı	71
Şekil 13: MPO aktivitesinin gruplara göre dağılımı	72
Şekil 14: Kitotrioidaz aktivitesinin gruplara göre dağılımı	73
Şekil 15: IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımı	74
Şekil 16: TLR4 düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	75
Şekil 17: PARP sonuçlarının gruplara göre dağılımı	77

RESİMLER

Resim 1:	İntrakardiyak kan alınması işlemi.....	45
Resim 2:	(A) Karın duvarına kesi yapılması, (B) karın duvarı flebinin kaldırılması, (C) karın duvarı flebi çıkarılması, (D) bağırsakların çıkarılması	46
Resim 3:	Laboratuarda kullanılan teknik, boya ekipmanları ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme	51
Resim 4:	Grup 1 Hematoksilen Eosin kesitleri	56
Resim 5:	Grup 2 Hematoksilen Eozin kesitleri, oklar villuslarda ayrışmayı göstermektedir	57
Resim 6:	Grup 3 Hematoksilen ve Eosin kesitleri	58
Resim 7:	Grup 3 patolojik alanlar, ince ok subepitelyal ödem ve dökülme, kalın ok villus kaybı ve noktalı ok villuslarda ayrışmayı göstermektedir	58
Resim 8:	Grup 4 Hematoksilen ve Eosin kesitleri	59
Resim 9:	Grup 4 patolojik alanlar, ince ok villus kaybı, kalın ok villus küntleşmesini göstermektedir	60
Resim 10:	Grup 5 Hematoksilen ve Eosin kesitleri, ince ok submukozal ödemi göstermektedir	61
Resim 11:	Grup 5 kalın ok subepitelyal ödem ve ayrışmayı, ince ok epitelyal ayrışmayı göstermektedir.....	62
Resim 12:	Gruplarda PAS boyanması	64
Resim 13:	Gruplarda bağ dokusu boyanması	65
Resim 14:	Sudan Black boyası ile nötrofillerin gösterilmesi, taralı alanların büyük büyütmelemleri gösterilmiştir	66
Resim 15:	Gruplarda TUNEL ile boyanmış preparatlar.....	66

BİRİNCİ BÖLÜM

1.Giriş ve Amaç

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanlarda ortaya çıkan en sık gastrointestinal cerrahi acildir. Özellikle prematüre bebeklerde morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerindedir. Son yıllarda yenidoğan yoğun bakım birimlerinin gelişmesi ve prematüre bebeklerin daha uzun süre yaşatılabilmesi nedeniyle NEK sıklığı artış göstermiştir. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan preterm bebeklerde; %2-13 arasında, term bebeklerde ise %10 oranında görülmektedir. NEK gelişen hastaların %20-40'ı cerrahi girişim gerektirmektedir (1,2). Bir çoğunda karın içi abse, yapışıklıklar, rezeke edilen nekrotik bölgenin geniş olması ile uzun dönemde kısa bağırsak sendromuna bağlı gelişme geriliği gibi postoperatif komplikasyonlar gelişmektedir. Cerrahi gerektiren bebeklerde daha ağır olmak üzere uzun dönemli nöromotor gelişimsel geriliğe de yol açar. Nekrotizan enterokolitin seyri sırasında ölüm, değişik serilerde %10-60 arasında bildirilmiştir. Cerrahi uygulamalarda ise mortalite daha yüksek oranlara çıkmaktadır (1).

Nekrotizan enterokolitin patofizyolojisinde multifaktöriyel mekanizmalar rol oynamaktadır. En önemli risk faktörünün prematürite olduğu bilinmektedir. NEK'li olguların %65-95'i prematürdür. NEK insidansı gestasyonel hafta ve ağırlık ile ters orantılıdır (3-10). İmmatür intestinal mukaza, antioksidan sistemlerin yetersiz oluşu, azalmış intestinal motilite, immatür bağışıklık sistemi ve yetersiz oksijen dinamikleri nedeniyle NEK gelişimi daha kolaydır. Hipoksi ve iskemi term bebeklerde, erken hızlı beslenme, anormal intestinal kolonizasyon ve yangısal mediatörler prematüre bebeklerde NEK gelişimine etki eder (10-17).

Prematüre bebeklerde hipoksi ve iskemiye sekonder immatür dolaşım bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Herhangi bir nedenle oluşan hipoksi reoksijenasyon sürecinde yoğun olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri bağırsak dokusundaki hasardan sorumlu temel faktördür (16). Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu yanı sıra nötrofillerin aktivasyonunu yaratarak da bağırsak hasarı oluşturabilirler. Bu radikaller olayın meydana geldiği organda toksik etki göstererek doku hasarı ve apoptozise neden olur. Hipoksi ve reperfüzyon (H/R) sonrası serbest

oksijen radikalleri yoluyla oluşan lipid peroksidasyonu dokuda thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) düzeylerinin ölçümü ile kantitatif olarak saptanabilir.

Hasarlanan epitelyal hücrelerden ve aktive nötrofillerden salınan inflamatuvar mediyatörlerin başlıcaları platelet aktive edici faktör (PAF), nitrik oksid (NO), tümör nekroz faktörü (TNF), lökotrienler ve interlökin-6'dır (17). Yapılan birçok çalışmada, NEK'te bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında primer rol oynadığı saptanmıştır. İnaktif metaboliti olan lyso-PAF formuna dönüşümü PAF-spesifik asetil-hidrolaz (PAF-AH) enzimi ile katalize edilen PAF, NEK patogenezinde etkili temel inflamatuvar mediatör olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Lökotrienlerin (LT) nötrofil kemotaksisi, agregasyonunu sağlayarak, NEK patogenezinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bağırsak sisteminde gelişen iskemi sırasında LTB4 ve kompleman sistemi aracılığı ile nötrofillerin hasarlı bölgeye göçü ve agregasyonu gerçekleşir. Ayrıca bağırsak iskemisi sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisi ile de nötrofiller aktive olur, hasarlı bölgeye migrasyonları sağlanır. Yine PAF ve lipopolisakkarit ile oluşturulan deneysel NEK modelinde nötrofil aktivasyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Dokuda myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü ile nötrofil aktivasyonu indirekt olarak konur.

Patogenezini tam olarak halen aydınlatılamayan bu hastalıkta ortak son yol intestinal nekroz ve inflamasyondur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda H/R hasarı sonrası gelişen intestinal hasarda apoptozun önemli ve belki de temel faktörlerden biri olduğu bildirilmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda hipoksi-reoksijenizasyon ile oluşan barsak hasarında barsak villuslarında TUNEL reaksiyonu ile artmış apoptotik hücreler bulunmuştur. Deneysel fare NEK modelinde aktif kaspaz-3 düzeyi, TUNEL testi ve histolojik barsak hasar skorları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Prematüre bebeğin bakteriye ait Toll-like reseptör (TLR) aktivasyonu sonrası dengeli anti-inflamatuvar yanıt olmadan pro-inflamatuvar sinyalizasyona daha yatkın olduğu ve bu durumun NEK patogenezine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yine artmış TLR4 ekspresyonun bağırsaklarda apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (17).

Hücrel oksidatif stres ve DNA hasarı varlığında artmış PARP aktivasyonu ortaya çıkabilir ve bu durum apoptozise neden olabilmektedir.

Nekrotizan enterokolit gelişiminde, nötrofillerden salınan mediatörlerin ve oksidan-antioksidan dengesinin etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmanın hipotezi nötrofillerin fazla olduğu ortamda ortaya çıkan mediatörlerin NEK gelişimini kolaylaştırdığıdır. Yaşamın 15.-20. gününde 10-20 g fare yavrularında H/R ile oluşturulan deneysel nekrotizan enterokolit modelinde nötrofil sayısının ve nötrofillerden salınan mediatörlerin nekrotizan enterokolit gelişimine katkısının belirlenmesi, PARP ve TLR4 ve IL-6 düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

2.GENEL BİLGİLER

2.1. EPİDEMİYOLOJİ

Nekrotizan enterokolit (NEK) primer olarak prematüre bebekleri etkileyen bağırsakların akut yangısal nekrozudur. Ciddi coğrafik varyasyon göstermesine karşılık, insidans 1500 gram altında doğan bebeklerde %7 ile %10 arasında değişmektedir. NEK gelişen bebeklerde mortalite oranı %25 ile %30 arasında değişir ve %50 olguya cerrahi işlem uygulanmaktadır. NEK sonrası sağkalan olgularda bağırsakta darlık ya da kısa bağırsak sendromu gibi komplikasyon riski ve özellikle cerrahi geçiren olgularda anormal nörogelişimsel sonuçlar ciddi olarak artmıştır (1).

Term bebeklerde NEK (bildirilen olgularda %5-%10) daha az görülmesine karşın konjenital kalp hastalığı, doğum asfiksisi, polisitemi, kan değişimi ya da intrauterin büyüme geriliği gibi durumlarla ilişkilidir (2). Preterm bebeklerde NEK insidansı gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı ile ters orantılı olarak değişir. Erkeklerde ve Afrika-Amerikan kökenli bebeklerde insidans daha yüksektir (3).

NEK başlangıç yaşı gestasyonel yaş ile ters ilişkilidir; term bebekler için ortalama 3-4 gün, 28 hafta altında doğan prematüre bebekler için 3-4 haftadır. NEK için en tutarlı risk faktörü prematüredir. Az sayıdaki populasyon tabanlı çok merkezli çalışmada NEK oranları stabil kalmıştır (4-6). Hem NEK insidansı hem de NEK olgu ölüm oranları doğum ağırlığı ve gestasyonel yaş ile ters orantılıdır (7). Küçük, daha ciddi hastalığı olan ve cerrahi gerektiren bebeklerde ölüm oranları daha yüksektir (8-10).

NEK hastalarının çoğu daha önce enteral yolla beslenmiştir. NEK hiç beslenmeyen prematüre bebeklerde de oluşabilir ancak ayrı bir patoloji olan kendiliğinden bağırsak perforasyonu çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde doğumdan sonraki birkaç hafta içinde ve beslenmeye başlamadan önce ortaya çıkar (11-12). NEK olgularının yaklaşık %20-40'ı cerrahi geçirmektedir. Cerrahi geçiren olgularda yara yeri açılması, karın içi abse, bağırsakta striktür ve kısa bağırsak sendromu ortaya çıkabilir (13). Kendiliğinden bağırsak perforasyonu olan olgular daha erken ortaya çıkar. Klinik ve patolojik olarak NEK bulguları ortaya çıkanlardan prognozları daha iyidir (Tablo 1).

Tablo 1: Nekrotizan enterokolit ile kendiliğinden bağırsak perforasyonu arasındaki klinik farklılıklar

	Nekrotizan enterokolit	Kendiliğinden bağırsak perforasyonu
İnsidans < 1500 g	%7-10	%2-3
Başlangıç yaşı	2-6 hafta	0-14 gün
Pnömatosis	Var	Yok
Enteral beslenme	Var	Yok
Villus nekrozu histolojik kanıtı	Var	Yok
Mortalite	Bazal %10-30 üstü	Bazal %5-10 üstü

2.2. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM FİZYOLOJİSİ

Gastrointestinal traktus ve aksesuar sindirim organları ağızdan anuse kadar uzanan primitif bağırsağın şekil değiştirmesi sonucu oluşur. Kıvrılma sürecinde yolk kesesi dorsal kısmı emriyoya katılırken 4. haftada primitif bağırsak gelişir. Üçüncü gestasyonel haftada primitif bağırsak uzar ve üç ana bölüme farklılaşır. Dördüncü gestasyonel haftada sindirim tüpü dorsal ve ventral mezenterler ile asılı durur (14).

Gastrointestinal sistem 10. gestasyonel haftada karın içine rotasyonunu ve oluşumunu tamamlar. On altıncı gestasyonel haftada fetus amniotik sıvıyı yutmaya başlar. Amniotik sıvı bağırsaklara büyüme faktörleri ve immün özellikler kazandırır. Düzenli peristaltizm yaklaşık 29-30. haftada oluşmasına karşılık gastrointestinal aktivite 24. haftadan itibaren başlar. Fetus uterus içinde büyümeye ve gelişmeye devam ettikçe, koordine olmuş emme ve yutma 32-34. haftalarda ortaya çıkar. Termde fetus günde 450 mL/kg amniotik sıvıyı yutar. Bu sıvı karbonhidrat, protein, yağ, elektrolit, immunglobulin ve büyüme faktörlerini içerir. Bu faktörler gastrointestinal sistemin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (15). Preterm doğum bu gelişimi aksatmaktadır.

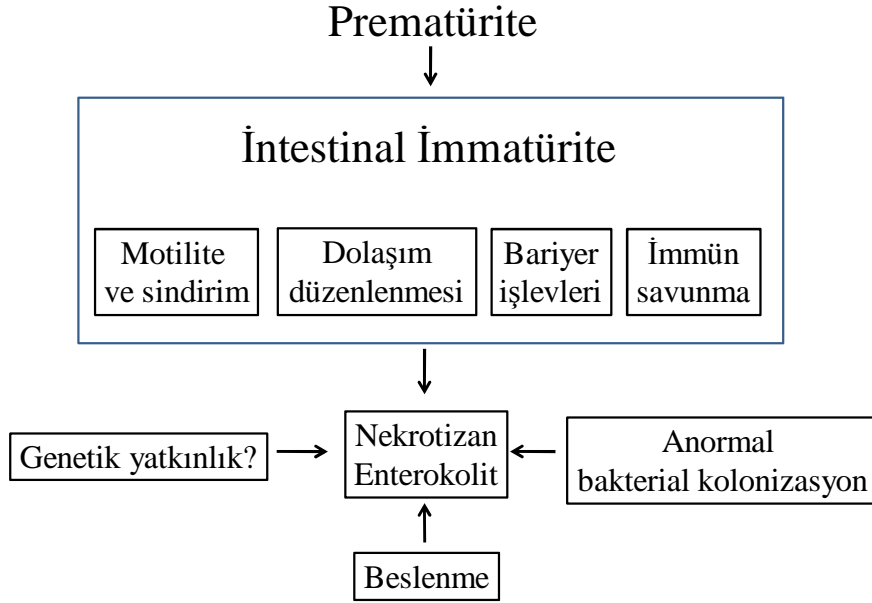
Gastrointestinal sistemin işlevi besin maddelerinin sindirim ve emilimi yanı sıra atık ürünlerin elimine edilmesinden oluşur. Yenidoğanda gastrointestinal işlevlerde anatomik, fizyolojik ve işlevsel sınırlılıklar vardır. Doğum sırasında gastrointestinal sistem bebeğin enerji, besin ve sıvı gereksinimlerini tam olarak karşılayacak durumda olmalıdır. Doğum sonrası bağırsak mukozası 4-6 hafta immatür kalır. Bu dönemde

antijenler ve diğerk makromoleküller bağırsak epitelinden geçerek sistemik dolaşıma katılır. Bu da infeksiyon ve alerji gelişimi riskini arttırır. Bağırsaklar doğumda sterildir ancak bebeğin mama ya da anne sütü almasına göre hızla kolonize olurlar. Gastrointestinal hormonların salınımı ile doğumdan sonra bağırsak matürasyonu hızlanır. Bağırsak hormonlarının salınımı ve aktivitesi enteral besleme ile başlatılır (15).

Gastrointestinal sistem gelişimi 3 fazda oluşur. Erken gestasyonel haftalarda organogenez oluşur. Hormonlar, enzimler, refleksler gibi işlevsel bileşenleri orta ve geç gestasyonel haftalarda gelişir. On ikinci gestasyonel haftada fetus amniotik sıvıyı yutabilir ve peristaltizim aktiftir. İntrauterin yaşamda amniotik sıvının yutulması amniotik homeostaz için önemlidir. Amniotik sıvı postnatal gastrointestinal işlevler için düzenleyici rol oynar. Hormon ve düzenleyici peptidlerin salınımını sağlayan besin maddeleri, hormonlar ve büyüme faktörleri bağırsak büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinden sorumludur. Bu gelişimin prematürite nedeni ile aksaması gastrointestinal sistem entegrasyonunu ve işlevlerini etkiler (14,15).

2.3.NEKROTİZAN ENTEROKOLİT PATOGENEZİ

NEK patogenezi Şekil 1'de gösterilmiştir. Prematüre bebeklerde NEK riski yüksek olduğu için bağırsak traktusunun immatüritesi NEK gelişiminde öne sürülmüştür. Bağırsak traktusu immatüritesi gastrointestinal motilite, sindirim yeteneği, dolaşım düzenlenmesi, bariyer işlevi ve immun savunmayı içermektedir. Bu işlevlerin immatüritesi prematüre bebekleri bağırsak hasarına ve hasara uygun olmayan yanıtla yatkın kılar. Prematüre bebeğin immatür hücreleri tarafından yenidoğan döneminde gastrointestinal hasara abartılı oluşturulan yangısal yanıt bu alandaki başı çeken hipotezdir (16).



Şekil 1: Nekrotizan enterokolit patogenezi

NEK olguları tipik olarak yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde uyarıcı bir işaret olmadan sporadik olarak ortaya çıkarlar, fakat bazen spesifik patojene bağlı epidemiler ile ilişkili olabilirler. Bu epidemiler *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*,

Clostridia spp., koagulaz negatif stafilokok ve rotavirüsleri içeren değişik organizmalar ile ilişkili olabilir. NEK direkt olarak infeksiyöz ajanlar ile oluşmamaktadır ancak anormal mikrobiyal floraya ek olarak bağırsak iskemisi, mukozal savunma mekanizmalarının tam gelişmemesi ve enteral beslenme hastalığının başlamasına ve patogeneziye yangısal yanıtın aktivasyonu ile katkıda bulunmaktadır (17).

2.3.1. İmmatür Bağırsak Motilitesi ve Sindirim

İmmatür bağırsak motilitesi ve sindirim prematüre bebeklerde NEK'e yatkınlığa yol açabilir. İnsan ve hayvan çalışmalarında gösterildiği üzere gastrointestinal traktus peristaltizmi gelişimsel olarak düzenlenmektedir (18,19). Gastrointestinal motilite ikinci trimesterde başlamasına karşın üçüncü trimestere kadar matürasyonu tamamlanmaz. Bağırsaklarda peristaltik dalgaları geçiren motor kompleksler 34. gestasyonel haftaya kadar bulunmaz (20). Dış faktörler eksternal motiliteyi

etkileyebilir. Prematüre bebeğin beslenmesi matürasyonu arttırmaktadır (21). Ancak fetal hipoksi ya da perinatal asfiksi bağırsak motilitesini azaltmaktadır (22,23). Bağırsakların azalmış peristaltizm aktivitesi nedeniyle epitelyum ile temasta olan hasar verici maddelerin artmış birikim riski vardır ve bu maddeler bağırsak hasarına yol açabilir. İmmatür bağırsaklarda ayrıca besin maddelerinin sindirimi ve emilimi azalmıştır (24). Lin ve ark (25) çalışmasında azalmış bağırsak emilimi ile birlikte kısa zincirli yağ asitlerinin artmış üretimi direkt ve azalmış pH ile indirekt bağırsak hasarına yol açmaktadır. Bozulmuş besin maddeleri emilimi geciken geçiş zamanı ile birleşince bariyer savunmaları azalmış immatür bağırsaklarda hasara yol açmaktadır.

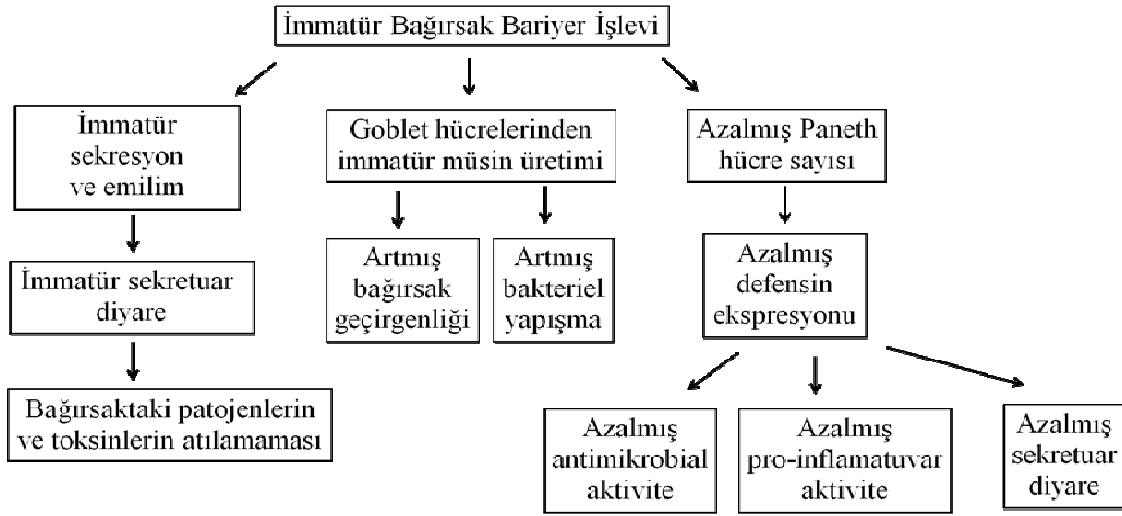
2.3.2. İmmatür Bağırsak Dolaşım Düzenlenmesi

NEK belirgin olarak prematüre bebeğin hastalığıdır ve term bebeklerde nadiren görülür. Term bebeklere ortaya çıkan NEK konjenital kalp hastalığı, hipoksik-iskemik olay, polisitemi, intrauterin büyüme geriliği gibi spesifik risk faktörleri ile ilişkilidir (26). Bu risk faktörleri bağırsak kan akımında sorun oluşturan durumların term bebeklerde NEK yatkınlığı oluşturduğunu göstermektedir. Term bebeklerde ortaya çıkan NEK olgularında ileoçekal bölge sıklıkla tutulmaktadır. İleoçekal bölge bağırsaklar içinde kanlanması sınırda olan bir bölgedir ve term bebeklerde hipoksik-iskemik olayın patofizyolojide yer aldığını göstermektedir. Term'de ortaya çıkan 'diving seal refleksi' (dalma refleksi) terimi kanın kalp ve beyine yönlendiğinde bağırsak ve diğer esansiyel olmayan organlarda ortaya çıkan hipoksik ya da iskemik hasarın mekanizmasını açıklamak için kullanılmıştır (27). Term NEK olgularında hipoksik-iskemik stresin bulunduğu dair inandırıcı kanıt bulunmasına karşın, preterm NEK'te farklı bir hastalık süreci bulunmaktadır. Term NEK'in yaşamın ilk birkaç günü ortaya çıkmasına karşın preterm NEK daha sonra ortaya çıkar ve perinatal hipoksik-iskemik olayın patogenezdaki yeri daha azdır. İnsanda ortaya çıkan NEK ile uyumlu patolojik değişiklikler oluşturan asfiksi kullanılan hayvan modelleri 1970'li yıllarda geliştirilmiştir ve laboratuvar çalışmalarında kullanılmaktadır. Hipoksi-iskemi ayrıca immatür dolaşım düzenlenmesi üzerinden de etkili olmaktadır. İmmatür bağırsakta iskemiye yanıt olarak dolaşım düzenlenmesinde değişiklik olduğu gösterilmiştir (28-29). İmmatür bağırsakta vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon dengesi araştırılmıştır. NEK olan bebeklerde prematür bağırsakları iskemik hasara yatkın duruma getirebilecek

olan azalmış endotelial nitrik oksid sentaz aktivitesi ve azalmış arteriolar nitrik oksid yapımı saptanmıştır (30-31).

2.3.3. İmmatür Bağırsak Bariyer İşlevi

Bağırsak epiteli komensal bakteriler ile birlikte simbiotik olarak bulunmalı ve potansiyel patojenlere karşı korumayı sürdürmelidir (32). (Şekil 2).



Şekil 2: Prematüre bebekte immatür bağırsak bariyer işlevleri

Bağırsak bariyer işlevleri, prematüre bebekte az gelişmiş olan, yapısal ve biyokimyasal savunma mekanizmalarından oluşur. Bu bariyerin patojenler, komensal bakteriler ya da parsiyel sindirilmiş gıdalar ile bozulması çok duyarlı olan submukozadaki yangısal sistemin aktive olmasına neden olur. Bu durum bağırsak hasarı ve yangının kötüleşmesine yol açan kısır döngünün ortaya çıkmasına neden olur. İmmatür bağırsak bariyer işlevleri yapısal ve biyokimyasal bariyer olarak iki başlıkta değerlendirilmektedir:

2.3.3.1. Yapısal Bariyer: Bağırsaktaki yapısal bariyer bağırsak epitelinin bir arada tutan 'tight junction'lardan oluşmaktadır. 'Tight junction' kompleksleri 10. gestasyonel haftada oluşur. Ancak tam gelişmiş bağırsak epitelyum bariyer işlevi besin emilimi ve sıvı salınımı yeteneğini gerektirir ki bu maturasyon amniotik sıvı etkisi altında 26.

haftada başlayıp terme kadar oluşur (33). Sıvı sekrete etme yeteneği konak savunması için özellikle önemlidir çünkü enterositler klor ve su sekresyonunu (sekretuar diyare) istenmeyen toksinleri ve patojenleri bağırsak lumeninden temizlemek için kullanır (34). Müsin gen ekspresyonu 23-27. haftada başlar ve olgunlaştıkça daha visköz ve etkili olur (35). İmmatür müsin tabakası artmış bağırsak permeabilitesine ve artmış bakteri yapışmasına neden olur. Bu önemli bağırsak epitelyal bariyerin geçilmesi patojenik ve patojenik olmayan uyarılar ile bağırsak hasarına yol açar. İnsan ve hayvan çalışmalarında bu yapısal epitelyal bariyerin bağırsak sağlığını sürdürmede önemli olduğu gösterilmiştir. Preterm bebeklerde bağırsak permeabilitesi artmıştır ve NEK tanısı konan bebeklerde bağırsak permeabilitesinde daha da büyük artış gösterilmiştir (36,37). İnsan ve hayvan NEK rezeksiyon materyallerinin incelenmesinde apoptoz ya da nekroz yolu ile bağırsak epitelinin kaybının yangından önce ortaya çıktığı ve bunun hastalığın patogenezindeki başlatıcı adım olabileceği gösterilmiştir (38). Clark ve ark (39) çalışmasında NEK oluşan sıçanlarda artmış parasellüler geçirgenlik, azalmış Goblet hücre sayısı ve müsin üretimi ve 'tight junction' protein ekspresyonunda değişim izlenmiştir.

Bağırsak epitel bütünlüğü prostaglandinler, nitrik oksid ve epidermal büyüme faktörü ile sağlanmaktadır. Prostaglandinler tight junction birleşimini ve parasellüler direnci artırarak bariyer işlevlerinin düzelmesini sağlar. Bu durum prostaglandin inhibitörü olan indometazin ile kendiliğinden bağırsak perforasyonu arasındaki ilişkiyi açıklayabilir (40).

Nitrik oksid bağırsak fizyolojisinde paradoksal rol oynamaktadır; düşük düzeyleri mukozal kan akımını arttırmakta ve mukozal bütünlüğün sağlanmasında rol almaktadır. Ancak artmış nitrik oksid düzeyleri bağırsak epitelinde sitopatik etki oluşturur. Bu durum 3 mekanizma ile olmaktadır (41).

1. Membran oksidasyonu ile epitelyum hasarı
2. Epitelyal apoptozis induksiyonu
3. Direkt mitokondrial hasar

Enterositlerden fazla miktarda nitrik oksid üretimi ile ortaya çıkan epitelyum hasarı bariyer yıkımına yol açmakta ve prematüre bebeklerde NEK yatkınlığı oluşturmaktadır (42). Epitelyal büyüme faktörü bağırsak bariyer işlevlerinde önemli rol oynamaktadır. Hasara yanıt olarak epitelyal büyüme faktörü epitelyum hücrelerinin

migrasyonunu ve çoğalmasını artırır ve bağırsak hasarının azaltılmasına yardımcı olur. Hayvan modellerinde epitelyal büyüme faktörü verilmesi bağırsak bariyer gücünü arttırmış ve deneysel NEK hasarını azaltmıştır. Azalmış epitelyal büyüme faktörü düzeyleri NEK olan prematüre bebeklerin serum ve tükürüklerinde gösterilmiştir (43).

2.3.3.2. Biyokimyasal Bariyer: Paneth hücreleri küçük bağırsak kriptlerinin tabanında yerleşen özelleşmiş enterositlerdir. Paneth hücreleri, bağırsak epitelyum bariyerinin biyokimyasal savunmasına lizozim, fosfolipaz A₂ ve küçük antimikrobiale peptidler (aynı zamanda absorptif enterositler tarafından da salınır) salarak ve bakterial populasyonun içeriğini ve yayılımını düzenleyerek katkıda bulunur (44). Bağırsak kökenli anti-mikrobiale peptidlerin iki ana ailesi defensin (alfa ve beta) ve cathelicin adlı yapılardır (45). Paneth hücreleri mikrobiyal uyarıya karşı primer olarak alfa-defensin, bağırsak epitelyal hücreleri proinflamatuvar uyarıya karşı primer olarak beta-defensin salgılar (46). Bu antimikrobiale peptidler, bakteri, virus, mantar, protozoa ve spiroketleri içeren geniş spektrumu olan doğal antibiyotiklerdir (47). Alfa-defensin salınımı mikrobiyal uyarılara yanıt olarak oluşur. Alfa-defensin varlığı Paneth hücrelerinde prenatal olarak gösterilmiştir. Paneth hücre antimikrobiyal peptidleri patolojik ve komensal bakterilerin seçiminde ve büyümelerinin sınırlandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Antimikrobiale peptidler bağırsak epitelyal proinflamatuvar ve sekretuar yanıtlarını artırarak da konak savunmasına katkıda bulunmaktadır (48).

1. Antimikrobiyal peptidler sitokin salınımı ile proinflamatuvar kaskadı başlatır ve immün hücrelerin toplanmasını sağlar.
2. Antimikrobiyal peptidler klor iyon sekresyonunu aktive ederek istenmeyen toksinlerin ve patojenlerin bağırsak kriptlerinden temizlenmesini sağlar.

NEK gelişiminde defensin ekspresyonunun etkisi ile ilgili çalışmalara gereksinim vardır.

2.3.4. Bağırsak İskemisi

İlk yapılan gözlemlerde doğum asfiksisi ve diğer nedenlerle bağlantılı olan şok ile ilişkili olarak ortaya çıkan belirgin bağırsak iskemisi durumları NEK'e benzer bağırsak nekrozuna yol açmaktadır. Suda yaşayan memelilerde görülen 'dalma refleksine' benzer, stres durumlarında kan akımı splanik dolaşımdan uzağa yönlendirilmekte ve bu durum bağırsak iskemisi ile sonuçlanmaktadır (49). Yenidoğan hayvanlarda bağırsak dolaşımında anormal düzenlenme gösterilmiştir ve bu durum NEK'e yatkınlığa yol açmaktadır. Fetusta bazal bağırsak damar direnci artmıştır ve doğumdan hemen sonra ciddi olarak azalarak güçlü bağırsak ve somatik büyüme için gerekli olan hızlı bağırsak kan akımına izin verir (50). İstirahat damar direncindeki bu değişiklik dilatör (nitrik oksid) ve konstriktör (endotelin) arasındaki dengeye ve myojenik yanıtla bağlıdır. İnsan NEK hastalarında bu vazoaaktif mediatörlerdeki değişiklikler gösterilmiştir (51,52). Dolaşım stresine yanıt olarak yenidoğanda bağırsak akımı ve/veya damar direnci bozulabilir. Hipotansiyona yanıt olarak yenidoğan domuz yavrularında defektif basınç-akım otheregölasyonu gözlenmiş ve bu bozulmuş bağırsak oksijen taşınması ve doku oksijenizasyonuna yol açmıştır (53). Bağırsak vazomotor tonusunu etkileyen birçok kimyasal mediatör (nitrik oksid, endotelin, substans P, norepinefrin ve angiotensin) vardır ve stres altındaki yenidoğanda, bunların anormal düzenlenmesi bozulmuş dolaşım otheregölasyonuna, bağırsak iskemisi artışına ve doku nekrozuna yol açabilir.

Bağırsak kan akımında değişiklik ile ilişkili olan klinik faktörler NEK riskini etkileyebilir. Umbilikal arter kateterleri kullanımı ile NEK riski arttığına dair kesin veri olmasa da bu kateterlerin kullanımı bağırsak damarları için tehdit oluşturabilmektedir (54). Patent duktus arteriosusun (PDA) varlığı ve soldan-sağa şant diastolde bağırsaklarda bozulmuş kan akımına yol açar. Rasgele dağılımlı, kontrollü bir çalışmada 1000 gram altı bebeklerde cerrahi ligasyon ile profilaktik duktus arteriosus kapatılması sonucu NEK riski %8 iken kontrol grubunda %30 saptanmıştır (55). Diğer çalışmalarda PDA'dan çok, PDA kapatılmasında kullanılan indometazin'in bağırsak dolaşımına olan etkisinden dolayı NEK riskini arttırdığı belirtilmiştir (56). Maternal kokain kullanımı fetal bağırsak vazokonstriksiyonuna neden olabilir. Bazı hayvan çalışmalarında ve preterm insan gözlemsel çalışmalarında artmış NEK riski ile ilişkili bulunmuştur (57). Eritrosit süspansiyonu transfüzyonu ve artmış NEK riski arasında ilişki bulunmuştur ve bu durum ciddi aneminin hızlı düzeltilmesinin bağırsak vasküler otheregölasyonunu etkilemesine bağlanmıştır (58).

2.3.5. Konak Savunma Faktörleri

Prematüre bebekte gastrointestinal traktusta konak savunması belirgin olarak bozulmuştur. Patojenlerin mukozal tabakayı geçip invaziv infeksiyon oluşturmasını önleyen bağırsak savunma mekanizması çok karmaşıktır ve şunları içerir:

1. Deri, müköz membranlar, bağırsak epiteli, mikrovilluslar, epitelyal hücre sıkı bağlantıları ve musin gibi fiziksel bariyerler
2. Polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, eosinofiller, lenfositler gibi immün hücreler
3. Çok sayıda biyokimyasal faktörler.

Bağırsak geçirgenliği yenidoğanda ve özellikle prematüre bebekte bozulmuştur ve immünglobulinler, proteinler ve karbonhidratların sistemik dolaşıma geçmesine izin verir (59). İntestinal mukus, su, elektrolitler, müsin, glikoprotein, immünglobulinler ve glikolipidlerden oluşan kompleks bir jel'dir. Bakteriyel ve toksin invazyonuna karşı koruyucu etkisi vardır. İntestinal mukus gelişmekte olan hayvanlarda ve belki de prematür bebeklerde anormaldir (60). Bunlara ek olarak, epitelyumdan invazyon yapan organizmaların işlevlerini bağlanarak inaktive eden önemli bakteriostatik proteinler salgılanır. 'Human defensin' ve 'İntestinal trefoil faktör' gelişimsel süreçte düzenlenen ve NEK gelişiminde rol oynayabilecek olan proteinlerdir (61,62).

Konak savunmasına katkıda bulunan bağışıklık sistemine ait faktörler gelişmekte olan hayvanlarda tam etkili değildir. Örneğin, intestinal intraepitelyal lenfositler yenidoğanlarda azalmıştır (B ve T hücreleri) ve erişkin düzeylerine yaşamın 3-4. haftasına kadar ulaşmazlar (63). Yenidoğanlarda tükrükteki sekretuar immünglobulin A düzeyi belirgin olarak azalmıştır ve bu durum bağırsaklardaki azalmış aktiviteyi yansıtır (64). Anne sütü ile besleme anlamlı bir destek sağlar. Mama ile beslenen yenidoğanlarda bağırsak humoral immünitesi bozulmuştur ve bu eksiklik bu populasyonda infeksiyöz hastalık ve NEK sıklığında artış oluşturur. Yenidoğan mamalarına eklenen oligosakkaridler sekretuar IgA'yı arttırmakta ve bağırsak florasını anne sütü ile beslenmiş bebekler ile benzer hale getirmektedir. Bu değişim bağırsak infeksiyonu ve yangı gelişimini etkilemektedir (65).

Birçok kimyasal faktör bağırsak sağlığı ve bütünlüğü sağlanmasına katkıda bulunmaktadır ve prematüre bebeklerde birçoğu baskılanmıştır. Mukozal homeostazda etkili kritik faktörler şunlardır:

1. Laktoferrin (66)
2. Glutamin (67)
3. Epidermal büyüme faktörü (EGF) (68) Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) (69)
4. Transforme edici büyüme faktörü (TGF) (70)
5. İnsulin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1) (71)
6. Eritropoetin (72)
7. Gastrik asid (73)
8. Çoklu doymamış yağ asitleri (LCPUFA) (74)

Tüm bu faktörler bağırsak maturasyonuna ve yangısal kaskadın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Bu karmaşık sistem yenidoğanda değişiklik göstermektedir.

Anne sütü ile beslenen infantlarda NEK sıklığı daha az olduğundan ve anne sütü birçok hastalık için koruyucu olduğundan anne sütü içinde olan ve yenidoğan konak savunmasına katkıda bulunan faktörler araştırılmıştır. Anne sütünde immunglobulinler, lökositler ve çok sayıda antibakteriyel maddeler vardır. Bu maddeler (IgA/IgG, lökositler, laktoferrin, LCPUFA, EGF, HB-EGF, eritropoetin, platelet aktive edici faktör (PAF)-asetil hidrolaz) ile yapılan suplementasyonun NEK riskini azalttığı gösterilmiştir (67-70). Akisu ve ark çalışmasında (75) eritropoetin uygulamasının NEK'ten koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

2.3.6. Beslenme

2.3.6.1. Amniotik Sıvının Rolü

İn utero insan fetusu günde 100-200 mL/kg amniotik sıvı yutmaktadır (76) ve bu miktar orta ve geç gestasyonda total enerji ve protein alımının %15'ini karşılar (77). Amniotik sıvı alımının fetal bağırsak gelişiminde rolü vardır ve deneysel olarak fetal ösafagusun bağlanması hem vücut gelişiminde hem de ince bağırsak büyümesinde azalmaya yol açar (78). Amniotik sıvıda varolan yararlı maddelerin birçoğu anne sütünde de bulunmaktadır ve bu maddelerin hücresel büyüme ve çoğalma, hücreden hücreye sinyal iletiminde varsayılan işlevleri vardır (79).

Epidermal büyüme faktörü ve İnsulin-benzeri büyüme faktörü 1'in varlığı amniotik sıvının in utero doku ve enterosit büyümesini uyardığını göstermektedir (80). Amniotik sıvı içinde yer alan bioaktif peptidler ve hormonlar fetal gastrointestinal gelişim ve immünregülasyonda önemli rol alır (81). Amniotik sıvı içinde bulunan interleokin (IL)-10 ve TGF- β 'nin potansiyel anti-inflamatuvar etkileri vardır (82,83). Amniotik sıvı prenatal biyolojisi ile anne sütünün postnatal biyolojisi arasında birbirlerini işlevsel ve içerik açısından tamamlayıcı kısımlar vardır. İn utero amniotik sıvı alımı bağırsak dokusunu yüksek düzeyde kontrol edilen uterus içindeki durumdan doğumdan sonra ortaya çıkan mikrobial ve gıda maddeleri ile karşılaşmaya hazırlanmaktadır. Prematüre bebeklerde de amniotik sıvının bioaktif özellikleri bağırsakların postnatal gelişimini olumlu yönde etkilemektedir. Preterm domuz NEK modelinde amniotik sıvının etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada domuz amniotik sıvısının postnatal dönemde verilmesi bakterial dansiteyi azaltmış ve bağırsak yangısal yanıtını oluşturan genlerde değişik düzenlenmeyi uyarmıştır (84). Bu çalışmada da gösterildiği gibi amniotik sıvı yangısal yolakların baskılanması ve bir miktar antimikrobial etki ile bağırsak lezyonlarının oluşmasına karşı koruyucu etki göstermektedir.

2.3.6.2. Enteral ve Parenteral Beslenme

NEK gelişen olguların çoğunda enteral beslenme başlanmıştır. Beslenmenin hastalığın başlamasını nasıl uyardığı belli değildir. Yayınlarda potansiyel mekanizmalar olarak osmolar stres (85), toksik kısa zincirli yağ asitlerinin yan ürün olarak sentezlenmesi (86), beslenme hacimlerinin hızlı artırılması ile bağırsak distansiyonu ve anormal vasküler düzenlenmenin ortaya çıkması, bağırsak hormonları, mediatörlerinin aktivasyonu ve safra asid metabolizmasındaki değişiklikler (87) ortaya atılmıştır. Anne sütü bağırsak maturasyonunun sağlanmasında formulaya göre daha üstündür. Formula ile birkaç saat bile beslenmenin zararlı inflamatuvar reaksiyona yol açtığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir.

Önceden yapılan çalışmalarda beslenme başlatılmasının geciktirilmesinin NEK sıklığını azalttığı belirtilse de yakın zamanda yapılan çalışmalarda bu gözlemler desteklenmemiştir. Erken hipokalorik beslenmenin güvenli ve yararlı olduğu gösterilmiştir (88). Bir çalışmada ilk 10 besleme gününde küçük enteral besleme hacimlerinin uzatılmış kullanımı, besleme hacimlerinin günlük 20 ml/kg/gün artırıldığı

grup ile karşılaştırıldığında NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir (89). Besleme hacimleri, beslemenin başlama ve ilerletilme zamanı, güçlendirme stratejileri, PDA, indometazin tedavisi ve umbilikal arter kateter varlığı gibi durumlardaki yaklaşımlar ile ilgili ek bilgilere gereksinim vardır.

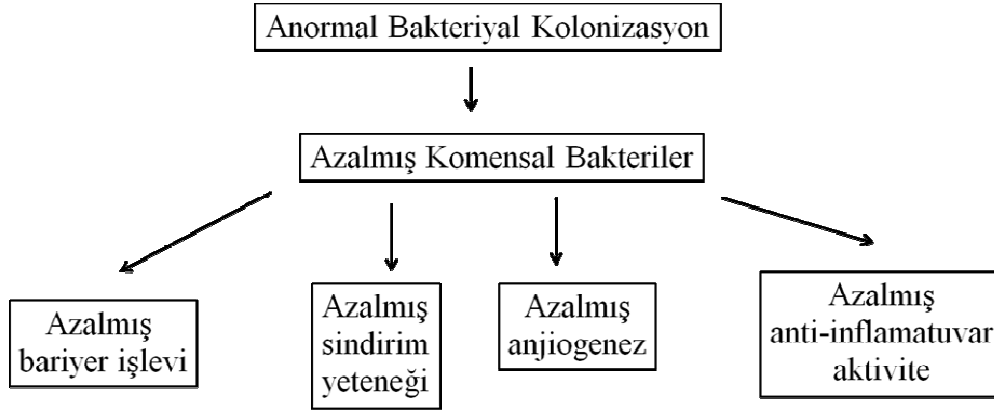
Enteral beslenme bağırsak büyümesinin önemli ve etkin bir uyarıcısıdır (90). Doğumdan sonra prematüre bebekler total parenteral beslenme ya da parenteral beslenme yanı sıra küçük miktarlarda enteral beslenmeye maruz kalmaktadır. Bu küçük miktarlardaki enteral beslenmeye 'minimal enteral beslenme' adı verilmektedir. Bu girişimdeki klinik temel enteral beslenme intoleransına karşın makul oranda gıda alımı sağlanması, metabolik ve hemodinamik stabilite sağlanana kadar gastrointestinal sistemin fazla yüklenmesinin önlenmesidir. Ancak total parenteral beslenmede bağırsak büyümesi, villöz yükseklik, mukozal kitle, protein kitlesi, hücre çoğalması ve mukozal immünite indekslerinin hepsi anlamlı oranda azalmaktadır (91). Mukozal yapı ve immun yanıtta bu yetmezlikler neonatal morbidite ve mortalite artışına yol açan artmış bağırsak permeabilitesi, bakterial translokasyon ve sepsiste artışa yol açmaktadır (92). Total parenteral beslenmenin prematüre bebeklerde artmış NEK riski ile ilişkili olduğu sonucuna varılamamıştır. Ancak total parenteral beslenme karaciğer yağlanması, kolestaz ve artmış yangısal yanıtı yol açmaktadır (93).

Ayrıca total parenteral beslenme uygulanan olgularda glukagon benzeri peptid 2, peptid YY, IGF-1, gastrin, motilin, glukoz-bağımlı insulintropik polipeptid ve vazoaaktif intestinal peptid gibi gastrointestinal hormonların düzeyleri azalmaktadır (94). Bu durum prematüre bebeklerde bağırsak stazına neden olmakta ve bağırsak stazı bakteri çoğalması, bakteri translokasyonu ve sepsise katkıda bulunmaktadır. Parenteral beslenme döneminde küçük hacimlerde enteral gıda verilmesi motilite ve işlevleri olumlu etkilemektedir (95).

2.3.7. Bakterial Kolonizasyon ve Pro-inflamatuvar Yanıt

Bağırsakların steril olduğu in utero ortamda NEK ortaya çıkmamaktadır ve bu durum patogeneze bakterilerin rol aldığını ortaya koymaktadır (Şekil 3). Gordon ve ark (96) çalışmasında virüs ile ilişkili NEK'in farklı bir hastalık olduğu öne sürülmüştür. Komensal ve patojenik bakteriler arasındaki istenmeyen denge NEK patogenezinde önemlidir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebekler özellikle 'disbiosis' adı verilen bağırsak mikrobiyotasının istenmeyen kompozisyonuna yatkındırlar. Sağlıklı term anne sütü ile

beslenen bebeklerde in utero steril olan bağırsaklar maternal flora ve çevreden edinilen organizmalar ile kolonize olur. İki hafta içinde *Bifidobacteria* ve fakültatif anaerobların baskınlığı görülür (97). Prematüre bebeklerde nozokomial flora ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde antibiyotiklere sık maruz kalma nedeni ile anormal bağırsak bakteriyal kolonizasyon riski fazladır. Çalışmalarda çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde duodenumun anormal *Enterobacteriaceae* ile kolonizasyonu gösterilmiştir (98). Dışkının erken *Clostridium perfringens* ile kolonizasyonu sonradan NEK gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (99). In vitro çalışmalarda bu durumun immatür bağırsak epitelyal hücrelerinde ortaya çıkan abartılı yangısal yanıtla bağlı olduğu gösterilmiştir (100,101).



Şekil 3: Nekrotizan enterokolit olgularında anormal bakteriyal kolonizasyon sonuçları

Distal bağırsak traktuslarında miktar ve çeşitlilik olarak zengin bakteri kolonizasyonu içeren term bebeklerle karşılaştırıldığında, preterm bebeklerde daha az bakteri miktarı ve çeşitliliği bulunmaktadır (102, 103). NEK hastalarında mikrobiyal çeşitliliğin gestasyonel hafta uyumlu kontrollerden daha az olduğu gösterilmiştir.

Bu popülasyonda total bakterial ortam bağırsak hasarı gelişimini etkileyebilmektedir (104). Bağırsak sağlığını iyileştiren ve yangısal yanıtla karşı koruyucu olan komensal organizmalar term yenidoğan, çocuk ve erişkin floralarında yer almaktadır. Prematüre bebeklerde *Bifidobacteria* spp ve *Lactobacillus* spp içeren bu organizmalar florada sık görülmemektedir. Sadece çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde görülen bu bakterial flora özelliklerinin mama ile beslenme, bağırsak iskemik stresi ve yetersiz konak mukozal immün yanıt durumlarında, pro-inflamatuvar sinyalleri başlattığı düşünülmektedir.

Bakteri ve diğer patojenler 'human toll-like receptor (TLR)' adı verilen özgül kalıp tanıyan reseptörleri aktive ederek kompleks sinyalizasyon kaskadını başlatabilmektedir (105,106). Escherichia coli gibi gram-negatif enterik bakterilerde hücre duvarı lipopolisakkaridi (LPS) yangısal ve immun hücreler üzerindeki özgül TLR4 reseptörünü aktive etmekte ve bir seri sinyal iletimi olayı sonucu nükleer faktör kapa B (NF-κB) nükleer translokasyonu oluşmakta ve interlökin (IL)-1, IL-8, TNF, nitrit oksid sentaz (iNOS) ve fosfolipaz A₂ gibi proinflamatuvar genlerin transkripsiyonu oluşmaktadır. Bu mediatörlerin prematüre bebeklerde arttığı gösterilmiştir ve sonuçta belirgin yangısal yanıt oluşturmaktadırlar (107,108,109). Normal koşullarda proinflamatuvar aktivasyon mukozal çevrede bakterial invazyona karşı koruyucudur. Anti-inflamatuvar sinyalizasyonun yetersiz olduğu durumlarda gereğinden fazla yangısal yanıt bağırsak inflamasyonuna ve nekrozuna yol açabilir.

Prematüre bebeğin bakteriye ait TLR aktivasyonu sonrası dengeli anti-inflamatuvar yanıt olmadan pro-inflamatuvar sinyalizasyona daha yatkın olduğu ve bu durumun NEK patogeneze katkıda bulunduğu teorik olarak düşünülmektedir. İnflamatuvar yanıtı baskılayıcı yanıtlar yetersiz olduğunda bağırsak mukozasında patolojik değişiklikler oluşmaktadır:

1. Epitelyal hücrelerde artmış apoptoz
2. 'tight junction' protein ve komplekslerinin bozulması
3. Artmış mukozal geçirgenlik (110)
4. Bakterial translokasyon (111)
5. Vasküler tonus ve mikrosirkulasyondaki değişiklikler (112)
6. İntestinal nekroza yol açan nötrofil infiltrasyonu ve birikimi

Aynı zamanda yenidoğan anti-inflamatuvar yanıtında da spesifik değişiklikler tanımlanmıştır:

1. Bakterial strese yanıt olarak IL-8 sentezleme eğilimi (113)
2. PAF-asetilhidroksilaz aktivitesinde eksiklik. PAF-asetilhidroksilaz enzimi etkili bir fosfolipid mediatör olan PAF'ın yıkılmasını sağlamaktadır. PAF mukozal hasarı başlatabilmektedir (114)
3. İnhibitör protein IκB inhibisyonuna bağlı bağırsak NF-κB aktivitesinde artış (115)

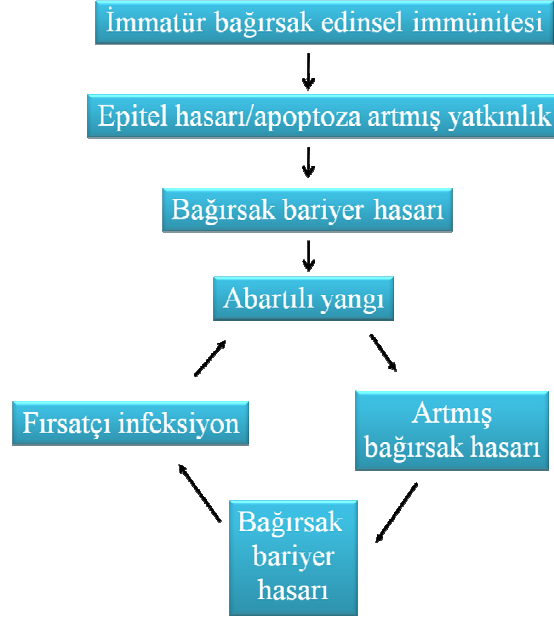
Epitelyal hücreler normalde mukozal yüzeyde TLR4 eksprese etmezken stres altındaki yenidoğan hayvanlarda ve NEK olan prematüre bebeklerde epitelyal

hücrelerin apikal yüzeylerinde TLR4 ekspresyonu artmaktadır (116,117). Bu bulgu NEK gelişen yenidoğanlarda gözlenen güçlü ve normalin dışındaki pro-inflamatuvar yanıtı açıklamaktadır.

2.3.8. İmmatür Bağırsak Edinsel İmmünitesi

İmmatür bağırsakta prematüre bebeği bağırsak hasarına yatkın kılan birçok potansiyel gelişimsel defektler vardır (Şekil 4). İmmatür bağırsak hasara fazla yangısal durum ile yanıt vermekte ve bu NEK patogenezinde en önemli durum olmaktadır. NEK patogenezinde rol alan yangısal mediatörler yukarıda sözü edilen PAF, tümör nekroz faktör ve interlökinlerdir (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18) (118). Yangısal yanıt koruyucu bir mekanizmadır. Potansiyel patojenlere karşı korunmada yardımcı olur ve hasar görmüş dokudaki ilk yanıtı oluşturur. Konak potansiyel tehlike belirtilerine yanıt olarak çözünür lokal mediatörlerin salınımını indükler ve kemotaktik ajanlar damar geçirgenliğini artırarak yangısal hücreleri toplar. Pro ve anti-inflamatuvar dengesizlik bağırsak hasarına katkıda bulunmaktadır. Bağırsakların mikroorganizmalardan zengin çevresinde yangı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Ortama gelen lökositler, oksidanlar ve proteazlar salarak bağırsak bariyerinde kollateral hasar oluştururlar. Bu durumda patojenler ve non-patojenler duyarlı olan mukozaya ulaşarak pro-inflamatuvar kaskadı daha da uyarır ve daha fazla doku hasarına yol açarak bir kısır döngü oluştururlar. Yetersiz yangısal yanıt bakterilerin fazla çoğalmasına, sinyalizasyon yollarının apoptoz ve bağırsak epitelyum hücre ölümüne yönelmesi ile bağırsak hasarına yol açar. İmmatür bağırsak hücreleri patojenik uyarılara karşı abartılı yangısal yanıt göstermektedir. Bağırsak hasarı patogenezinde ayrıca yangısal yanıtın immatür olması da yer alabilir. Azalmış yangısal yanıt bağırsakları savunmasız bırakır ya da sinyalizasyon yollarını programlı hücre ölümüne yönlendirir. Bağırsak epitelyal hücrelerindeki pro-inflamatuvar yanıtın baskılanması pro-apototik kaspaz yolağının aktivasyonuna ve sonuçta hücrenin ölümüne yol açar (119). Bağırsak hücrelerinde NF-κB aktivasyonu olmayan farelerde geçici hipoksiye yanıt olarak belirgin apoptoz yanıtı gözlenmiştir (120). Yangısal yanıtın gelişimsel olarak immatür olması bağırsak epitelinin apoptoza olan yatkınlığını arttırmaktadır. Konak sağlığı abartılı proinflamatuvar aktivasyon (doku hasarına ve klinik sekellere neden olan) ve yeterli olmayan yangı (mukozayı savunmasız bırakan ve kendine hasar veren) arasındaki ince dengeye bağlıdır.

Bağırsak epitelyal apoptozu NEK patogenezinde başlatıcı ya da gerekli bir basamak olarak görülmektedir. NEK olan infantlarda bağırsak villus kesitlerinde çok fazla epitelyal apoptoz izlenmiştir (121). TLR4 aktivasyonu epitelyal apoptozu uyararak ve bağırsak iyileşmesini azaltarak NEK'e neden olabilmektedir.



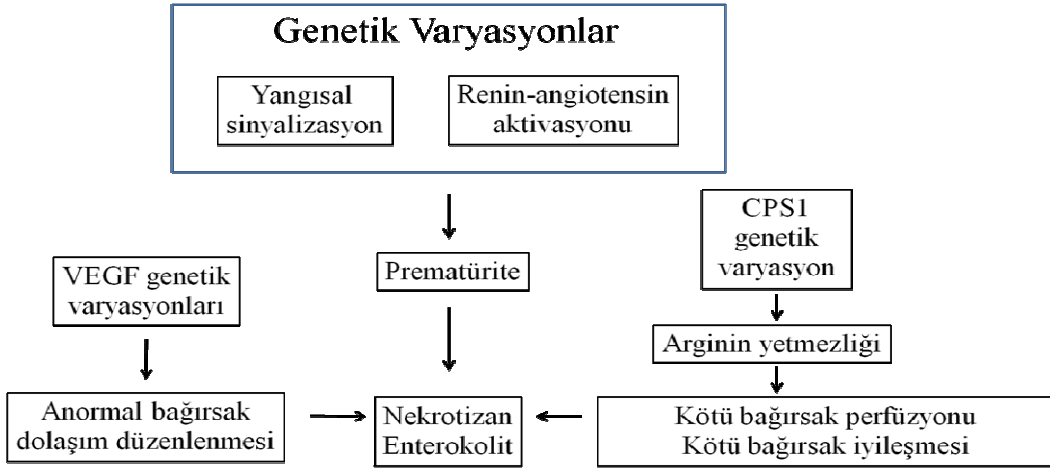
Şekil 4: İmmatür bağırsak edinsel immünitesi

2.3.9. Genetik Yatkinlık

Epidemiyolojik çalışmalarda cinsiyet, ırk, ikiz eşlerine dayalı olarak artmış hastalık riski saptanmıştır (122). Bu bağlamda tek nükleotid polimorfizmler değerlendirilmiş ve NEK yatkinlığı sağlayabilecek birçok yangısal genin polimorfizmi bulunmuştur (123). Bağırsak motilitesinin gelişimsel düzenlenmesi, sindirim, dolaşım, bariyer işlev ve edinsel immün savunmalar ile ilgili çalışmalar NEK ile ilgili daha iyi korunma ve tedavi stratejileri sağlayacaktır. Diyet ve komensal bakterilerin bu süreçlerin matürasyonunu nasıl etkilediği bu hastalığı anlamamıza yardımcı olacaktır. NEK patogenezinde prematürite, immatür bağırsak işlevleri ve immatür bağırsak savunma mekanizmalarının rolleri olması birçok gen ürünündeki potansiyel varyasyonların bu hastalığa yatkinlık oluşturabileceğini göstermektedir (Şekil 5). Bu varyasyonlar bir tek nükleotidi içeren varyasyon (tek nükleotid polimorfizm) sonucu ortaya çıkabilir. İmmatür dolaşım düzenlenmesi NEK patogenezinde rol almaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) için mutant allel açısından taşıyıcı durumunda olmak NEK için bağımsız risk faktörüdür (124). Bir diğer çalışmada 'Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1)' tek nükleotid polimorfizmi çalışılmıştır. CPS1 üre siklusunda hız belirleyici basamakta iş gören enzimdir.

CPS1 ile nitrik oksid prekürsörü olan L-Arginin üretilir. Prematüre bebekler bağırsak yara iyileşmesinde rol alan arginin açısından genel olarak bir eksikliğe sahiptirler (125). Ayrıca, arginin sentezi prematüre bebeklerde ince bağırsak işlevlerine dayanır ve parenteral beslenme ile inhibe edilebilir (126). NEK olan prematüre bebeklerde plazma arginin derişimi azalmıştır (127). Arginin yetmezliği nitrik oksid yapımını sınırlayarak mukozal perfüzyonu ve bütünlüğü bozmaktadır ve bu durum NEK yatkınlığı oluşturmaktadır. CPS1 genindeki mutant allel sayısı ile NEK insidansı arasında lineer ilişki bulunmuştur (128).



Şekil 5: Nekrotizan enterokolit olgularında genetik yatkınlık (CPS1: Carbamoyl phosphate synthetase 1, VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü)

2.4. KLİNİK BULGULAR

NEK klinik bulgu ve yakınmaları değişkendir. Erken dönemde; karın distansiyonu, kusma, artmış mide rezidüsü, enteral besleme tüpünden safra drenajı, hematokezya, dışkıda gizli kan görülür. Bu bulguların çoğu non spesifiktir, sepsis tablosunda ileusa bağlı olarak da görülebilir. İlerleyen NEK olgularında karında hassasiyet, karın duvarında eritem, ekimoz ve veya ele gelen genişlemiş barsak ansı ortaya çıkar. Sıklıkla non-spesifik olan, vücut ısısında instabilite, apne, bardikardi, letarji, kötü perfüzyon ya da hipotansiyon gibi sistemik bulgular bulunur. Bazı hastalarda artmış solunum desteği ihtiyacı ve inotrop desteğine ihtiyaç gösteren dolaşım bulguları ortaya çıkabilir.

Laboratuvar bulguları da non spesifiktir. Yangısal yanıt gösteren septik şoktaki hastalara benzer anormal lökosit sayısı (lökositoz veya lökopeni), trombositopeni (hızlı düşüş kötü prognoz işaretidir), kapiller kaçak, intravasküler sıvı azalması, metabolik asidoz, hipoglisemi, hiperglisemi, elektolit bozukluğu, akut tubular nekroz, solunum yetmezliği, hipotansif şok ve ölüm ortaya çıkabilir. Hastalığın tanısı ve hastalığın prognozu belirleyen biyokimyasal spesifik bir belirteç henüz tanımlanamamıştır.

Karın radyografisi NEK' te önemli bulgular sağlar. Erken evrede sepsistekine benzer bulgular görülür. Hava sıvı seviyesi, dilate barsak ansı ve barsak duvarında kalınlaşma saptanabilir. NEK'teki tanısal radyografik bulgu pnömatozis intestinalis'tir.

Bu bulgu Bell ve ark (129) tarafından önerilen ve Walsh ve Kliegman tarafından (130) değiştirilen evreleme sisteminde (Tablo 2) kullanılan kritik bir tanı ölçütüdür. Pnömatosis, karbonhidrat substratının bakterial metabolizması sonucu oluşan hidrojen gazının barsak duvarında birikimini göstermektedir. Portal venöz gaz, pnömatozis intestinalis yokluğunda bile tanısal değer taşır ve kötü pronozu gösterir (131). NEK bağırsak perforasyonuna ilerlerse, pnömoperitoneum ortaya çıkabilir. Serbest hava en tipik olarak çarpraz-masa lateral ya da sağ lateral dekübitus filmlerde izlenir. Bazen, serbest hava anteroposterior filmde santral periumbilikal koleksiyon 'football sign' olarak görülebilir. Pnömatosis ve portal venöz havanın ultrasonografik bulgularının tecrübeli gözlemci tarafından izlenebilir oldukları ve abdominal ultrasonografik görüntüleme ile erken ve kesin tanı sağlanabileceği gösterilmiştir (132,133).

Tablo 2: Nekrotizan enterokolit için modifiye Bell evrelemesi

Evre	Sistemik Bulgular	Bağırsak Bulguları	Radyolojik Bulgular	Tedavi
I. Şüpheli				
A	Sıcaklık instabilitesi, apne, bradikardi	Artmış pregavaj rezidü, hafif karın distansiyonu, dışkıda gizli kan	Normal ya da hafif ileus	NPO, 3 gün antibiyotik
B	IA ile aynı	IA ile aynı, ek olarak dışkıda makroskopik kan	IA ile aynı	IA ile aynı
II.Kesin				
A.Hafif hasta	IA ile aynı	I ile aynı ek olarak bağırsak sesleri yokluğu, karın hassasiyeti	İleus, intestinal pnömatozis	NPO, 7-10 gün antibiyotik
B.Orta hasta	IA ile aynı ek olarak hafif metabolik asidoz, hafif trombositopeni	I ile aynı ek olarak bağırsak sesleri yokluğu, abdominal sellülit, sağ alt kadranda kitle	IIA ile aynı ek olarak portal vende gaz, assit ile birlikte ya da değil	NPO, 14 gün antibiyotik
III.İlerlemiş				
A.Ciddi hasta bağırsak salim	IIB ile aynı ek olarak hipotansiyon, bradikardi, solunumsal asidoz, metabolik asidoz, dissemine intravaskular koagülasyon, nötropeni	I ve II ile aynı ek olarak generalize peritonit bulguları, belirgin hassasiyet ve karın distansiyonu	IIB ile aynı ek olarak kesin assit varlığı	NPO, 14 gün antibiyotik, sıvı resüsitasyonu, inotropik destek, ventilatör terapisi, parasentez
B.Ciddi hasta bağırsak perfore	IIIA ile aynı	IIIA ile aynı	IIB ile aynı ek olarak pnömoperitoneum	IIA ile aynı ek olarak cerrahi girişim

2.5. TIBBİ TEDAVİ

NEK tıbbi tedavisinde agresif destek bakıma odaklanılır. Çünkü hiçbir spesifik girişimin hastalık ilerlemesini sınırladığı gösterilememiştir. Başlangıç yönetimi, intravenöz sıvı desteğinin sağlanması, enteral beslenmenin kesilmesi, bağırsak içeriğinin nazogastrik drenaj ile dekompresyonu, kültürlerin gönderilmesi ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisidir. Seri karın bakışı ve radyografik görüntüleme yapılmalıdır. Antibiyotik tedavisi; ampisilin/aminoglikosid, ampisilin-sefalosporin ya da sık stafilokokkal kolonizasyonda vankomisin-aminoglikozid içerir. NEK olgularının sadece %20-%30'unda pozitif kan kültürü (134) saptanmasına karşılık tedaviye steril kan kültürleri olsa bile 7-10 gün devam edilir. Ancak, bu yaklaşımın yararı tam olarak anlaşılamamıştır.

NEK, üçüncü boşluğa büyük miktarda sıvı kaybına neden olan yangısal süreç olduğundan, tedavinin ilk 48-72 saatinde hacim desteği serbest olarak belirgin intravasküler hacim kaybı olmasa da sağlanmalıdır. Sıvı ve albumin gibi hacim genişleticilerin agresif kullanımlarına ek olarak dopamin gibi pressör ilaçların kan basıncı ve periferel perfüzyonun sağlanması için kullanımları gerekebilir. NEK olan bebeklerin çoğunda abdominal distansiyon ve diafragmanın yukarıya kompresyonuna bağlı apne ya da solunum sıkıntısı gelişebilir ve solunum desteği gerekebilir. Metabolik asidoz, hiperkalemi, trombositopeni, nötropeni, hiper ya da hipoglisemi, anemi ile birlikte dissemine intravasküler koagülasyon gelişen bu kritik hasta bebeklerde kan gazları, tam kan sayımları, elektrolitler, serum glukoz düzeylerinin sık izlenmesi gereklidir.

2.6. CERRAHİ TEDAVİ

Optimal yenidoğan yoğun bakımına karşın NEK hastalarının %10-%30'unda hastalık kötüleşir (135,136). Hastalığın daha hafif formu olan hastaların üçte birinde tıbbi tedavi ile hastalık düzelir ve hastaların yaklaşık %50'sinde cerrahi girişim gerekli olmaktadır. Cerrahi için en sık endikasyon pnömoperitoneum varlığıdır. Hiçbiri kesin olmamakla birlikte diğer cerrahi endikasyonlar şunlardır:

1. Agresif medikal tedaviye karşın klinik kötüleşme
2. Seri radyografilerde sabit genişlemiş bağırsak ansının varlığı

3. Parasentez ile peritonit ve gangrenöz bağırsak saptanması

Cerrahinin amaçları nekrotik bağırsakların rezeke edilmesi, bağırsakların ve serbest intraperitoneal havanın dekomprese edilmesi ve bağırsak uzunluğunun mümkün olduğunca korunmasıdır. Optimal tedaviye rağmen bebeğin kliniğinin kötüye gitmesi, artan pnömatozis, portal venöz gaz, çekilen seri karın filmlerinde dilate sabit barsak ansı görülmesi de cerrahi girişimi akla getirmelidir. Kliniği kötüye giden, filmlerde perforasyon tanımlanamayan hastalarda parasentez yapılabilir.

Cerrahi girişim devam eden yangının ve hastalığın ilerlemesini değiştirmedeği için NEK olgularında cerrahinin zamanlaması, yararı ve cerrahi yaklaşım şekli tartışmalıdır. Perforasyon olan olgularda cerrahi işlem endikasyonu olduğunu çoğu hekim kabul etmektedir. Ancak bu cerrahi girişimlerin yararları ve etkinlikleri çok çalışılmamıştır. Perkutan dren ile dekompresyon eksploratuar laparotomi kadar etkili olabilir. Peritoneal dren solunum işlevlerini bozan karın içindeki gazın dekompresyonunu sağlamakta ve bu durumlarda doğal iyileşme için zaman sağlamaktadır. Gözlemsel ileriye dönük değerlendirme (137), rasgele dağılımlı çalışma (138) ve uluslararası rasgele dağılımlı çalışmayı (139) içeren konu ile ilgili birçok çalışmada peritoneal dren ve laparotomi arasında mortalite, perfore olan NEK olgularında kısa-dönem gastrointestinal işlevler, klinik bulgu ve yakınmaların kötüleştiği NEK açılarından fark saptanmamıştır. Ayrıca, bu çalışmalarda perkutan dreni olan birçok hastada ek cerrahi eksplorasyon gerekli olmamıştır. Gerçekte, cerrahi girişim hastalık sonuçlarını değiştirmemektedir. Ancak uzun dönem komplikasyonlar açısından (kısa bağırsak sendromu, yapışıklık için reoperasyon, nörogelişimsel bozukluk) ileri çalışmalara gereksinim vardır.

2.7. UZUN DÖNEM KOMPLİKASYONLAR

NEK olgularının %70'den fazlası sağ kalsa da uzun dönem gastrointestinal komplikasyon olarak bağırsakta darlık ve kısa bağırsak sendromu ortaya çıkmaktadır. Darlık, yangısal bağırsağın fibrotik iyileşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tıbbi ve cerrahi hastalığı olan olguların %10-%35'inde görülmektedir (140). Darlık olan hastalarda tipik olarak NEK hastalığı iyileştikten 2-3 hafta sonra yineleyen abdominal distansiyon gelişir ve bu tanı ilk hastalıktan aylar ya da yıllar sonra ortaya çıkabilir. Çoğu olgu tıbbi olarak tedavi edilse de ciddi daralma durumunda cerrahi rezeksiyon

gerekli olabilir. NEK sonrası, cerrahi olsun ya da olmasın enteral beslenme ile normal büyümeye yetecek bağırsak kalmaması durumuna 'kısa bağırsak sendromu' denir. Yeterli büyüme için gerekli olan bağırsak uzunluğu tartışmalı olsa da bebeklerde 25-40 cm sağlam ince bağırsak gereklidir (141).

Prematüre bebeklerde, NEK gelişimi sonrası nörogelişimsel bozulma artmış sıklıkta görülür. Bir seri gözlemsel çalışmada, etkilenen hastalarda serebral palsy ve/veya mental retardasyon riski gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı uyumlu kontroller ile karşılaştırıldığında %57 daha yüksektir. Cerrahi geçiren NEK olgularında nörogelişimsel bozulma relatif riski 1.8 bulunmuştur (142). Bu ciddi uzun dönem komplikasyonun etyolojisi sistemik yangısal aktivasyon ve/veya enteral beslenmenin olmamasına bağlı beslenme eksikliğini izleyen beyaz cevher hasarı ile ilişkilidir. NEK sonrası sağ kalan olgularda kötü nörogelişimsel sonuç riski yüksektir. Sepsis ve NEK olan olgularda kötü gelişim, serebral palsy, görme ve duyma bozukluğu ve 18-22. aylarda Bayley Infant Gelişim skalasına göre kötü skorlar bildirilmiştir. Cerrahi geçiren olgularda kötü nörogelişimsel sonuç riski daha fazladır (143).

2.8. KORUYUCU STRATEJİLER

NEK başlangıcı tipik olarak akut ve hastalık ilerlemesi hızlı olduğundan tanı kesinleştikten sonra yapılan hiçbir tedavi edici girişim etkili olmamaktadır. NEK insidansını ve olgu ölüm oranını düşürmede en etkili yöntem preterm doğumların azaltılmasıdır. Tablo 3'de NEK'ten potansiyel koruyucu stratejiler gösterilmiştir.

Tablo 3: Potansiyel nekrotizan enterokolitten koruyucu stratejiler

Genel uygulanan	Araştırmaların devam ettiği
Anne sütü ile besleme	Arginin suplementasyonu
Konservatif besleme	IgA suplementasyonu
Trofik besleme	Epidermal büyüme faktörü
	Eritropoetin
	Antenatal steroidler
	Oral antibiyotikler
	Probiotik, prebiotik, postbiotik

Hayvan ve insan çalışmalarında NEK'in önlenmesi için birçok yaklaşım denense de anne sütü ile beslenme dışında hiçbir strateji standard uygulanır hale gelmemiştir. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde preterm bebeklerin anne sütü ile beslenmesinin dramatik olarak artışına karşın genel NEK insidansında bir azalma görülmemiştir. Hayvan modellerinde anne sütü ile besleme (144), IgA supplementasyonu (145), antibiotik profilaksisi, steroidler (146), probiotikler (147,148), çoklu doymamış yağ asidleri (149), PAF antagonistleri (150), PAF-asetilhidrolaz (151), EGF (152), trefoil faktör (153), lökosit kaybı (154), safra asid transport inhibitörleri ve oksijen radikal tutucuları (155) ile çalışılmıştır. İnsan çalışmalarında IgA/IgG, steroidler, çokludoymamış yağ asidleri, arginin (156), donör insan sütü va antibiotikler ile koruma denemelerinde sınırlı başarı sağlanmıştır. Bu çalışmaların sorunları kötü çalışma tasarımı, kötü istatistik güç olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu yaklaşımlar yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde preterm bebekler için rutin kullanım alanı bulamamışlardır. Bir demir transport proteini olan laktoferrin ek anti-inflamatuvar ve anti-mikrobal etkileri ile prematüre bebeklerde geç başlangıçlı sepsis ve NEK insidansını azaltmaktadır.

Koruyucu stratejiler aşağıdaki başlıklar altında incelenebilir:

A. Anne sütü ile besleme ve besleme stratejileri: Hem anne sütü ile besleme hem de konservatif besleme stratejileri NEK insidansını azaltabilmektedir (157,158). Lucas ve Cole (159) tarafından 1990 yılında yapılan geniş, ileriye dönük, çok merkezli çalışmada NEK mama ile beslenen bebeklerde sadece anne sütü ile beslenen bebeklere göre 6-10 kat fazla bulunmuştur. Bir miktar anne sütü almanın hiç almamaya göre koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Donör insan sütü ile besleme mamayla beslemeye göre NEK riskini azaltmaktadır (160). Konservatif besleme pratiği NEK'i azaltabilir ancak uzun süre ağızdan besin verilmemesi bağırsak atrofi ve yangısal yanıtın kötüleşmesine yol açarak NEK'e yatkınlık oluşturabilir. Diyet bağırsak gelişiminde ve savunmasında önemli rol oynamaktadır. Besleyici özelliği olmayan ve diyet içinde bulunan EGF ve poliaminler gibi maddeler bağırsak epitelyum büyümesini uyarmaktadır (161). Bazı besin maddeleri (glutamin, arginin, omega-3 yağ asidleri) pro-inflamatuvar aktivasyonu engellemekte ve bağırsak bariyer işlevlerini, çoğalmayı ve iyileşmesini arttırmaktadır (162). Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde trofik beslemenin başlatılması düşünülebilir. Trofik besleme sindirim

enzimlerinin aktivitesini arttırır, sindirim hormonlarının salınımını arttırır, bağırsak kan akımını ve motiliteyi arttırır. Trofik beslenme verilen bebeklerde daha iyi beslenme toleransı, daha iyi büyüme, azalmış sepsis ve azalmış hastanede yatış süreleri ortaya çıkmaktadır. Erken trofik besleme ile NEK insidansı artmamaktadır (163, 164).

B.Amino asid supplementasyonu: Arginin, nitrik oksid üretiminde nitrik oksid sentaz için tek substrattır. Nitrik oksid bağırsakta mukozal kan akımının düzenlenmesi, yangısal sinyalizasyon, bariyer işlevleri ve yara yeri iyileşmesini içeren birçok yararlı işlevlerde bulunmaktadır (165). Tek bir rasgele dağılımlı çalışmada prematüre bebeklere oral arginin verilmesi çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda arginin tüm evrelerdeki NEK insidansını anlamlı olarak azaltmıştır (166). Glutamin enterositler tarafından tercih edilen besin maddesidir ve bağırsak hücre çoğalmasını ve bağırsak bariyer bütünlüğünü arttırmaktadır. Düşük glutamin düzeyleri NEK gelişimi ile ilişkilidir ve hayvan modellerinde oral glutamin verilmesinin bağırsak yangısal hasarını azalttığı gösterilmiştir (167). Ancak, geniş çok merkezli rasgele dağılımlı bir çalışmada enteral glutamin prematüre bebeklerde NEK ve sepsis insidansını anlamlı olarak azaltmamıştır (168). Akısü ve ark (169) yaptıkları deneysel NEK çalışmasında, NEK oluşturulması öncesi oral olarak L-glutamin verilen yavru farelerde, L-glutamin verilmeyenlere göre intestinal hasarın belirgin oranda azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışma ile L-glutaminin deneysel NEK' de koruyucu etkisinin olduğunu ve bu etkinin inflamatuvar mediyatörlerin aktivitelerini önleyerek yaptığını ileri sürmüşlerdir.

C.İmmunglobulinler: İmmunglobulinler anne sütünün NEK'ten koruyucu olmasındaki etkili olası faktörlerden birisidir. Yenidoğanlarda genel olarak immunglobulin düzeyleri ve özellikle sekretuar IgA düzeyi düşüktür. Oral immunglobulin verilmesi NEK'ten korunmada etkisiz kalmıştır (170). İntravenöz immunglobulin uygulanması da NEK, sepsis ya da mortalitede anlamlı azalma göstermemiştir (171).

D. Epidermal büyüme faktörü: Gastorintestinal salgıların önemli bir bileşeni olan epidermal büyüme faktörü anne sütünde bulunan koruyucu faktörlerden birisidir. Epidermal büyüme faktörü aynı zamanda amniotik sıvıda bulunmaktadır ve hücre

çoğalması, migrasyon, sağkalım ve hasar sırasındaki mukozal onarımı arttırıcı rol oynamaktadır (172). Hayvan çalışmalarında epidermal büyüme faktörü verilmesinin NEK şiddetini azalttığı gösterilmiştir (152).

E.Eritropoetin: Eritropoetin anne sütünde ve amniotik sıvıda bulunan, bağırsak gelişimi, hücre migrasyonu ve bağırsak onarımında rol alan bir maddedir. Eritropoetin eritrosit üretiminin düzenlenmesinden sorumlu bir glikoproteindir.

Eritropoetin reseptörleri bağırsakta bulunmaktadır. Amniotik sıvı ve anne sütü yolu ile prenatal ve postnatal dönemde eritropoetin ile temas oluşmaktadır. Eritropoetin hücre migrasyonunu arttırmakta ve hasara uğramış hücrelerde koruyucu etkiler oluşturmaktadır. Ledbetter ve ark (72) 500 g ile 1250 g arası bebeklerde anemi için verilen rekombinant eritropoetin'in aynı zamanda NEK için de koruyucu olduğu hipotezini kurmuşlardır. Geriye dönük kohort analizde rekombinant eritropoetin alan bebeklerde 12/266 (%4.6), rekombinant eritropoetin almayan bebeklerde 24/233 (%10.8) NEK saptamışlardır.

F.Glukokortikoidler: Klinik çalışmalarda antenatal uygulanan glukokortikoidlerin NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir (173). Postnatal <96 saat, 7-14 gün ve 3 haftadan sonra yapılan glukokortikoidlerin NEK insidansına etkisi yoktur (174,175,176).

G.Oral antibiyotikler: NEK patogenezinde patojenik bakteriler ve değişmiş bakteriyel kolonizasyon etkili olduğundan oral antibiyotiklerin yeri araştırılmıştır. Oral antibiyotikler NEK insidansını azaltır (4). Ancak, bakteriyel antibiyotik direncine bağlı potansiyel kötü sonuçlar endişesi ile yenidoğan yoğun bakım birimlerinde profilaktik kullanımları uygulanmamaktadır.

H.Probiotik, prebiotik ve postbiyotikler: Probiotikler alındıklarında basit nutrisyondan daha fazla yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (177). Yenidoğan klinik çalışmalarında Lactobacillus, Bifidobacterium ve Streptococcus türleri çalışılmıştır (178,179). Prematüre

bebeklerde gastorintestinal kolonizasyon tam olmamaktadır ve Bifidiobacteria ve Lactobacillus türleri üç haftaya kadar kolonize olamamaktadırlar (180). Probiotikler kolonizasyon paternini normale döndürerek ve bağırsak işlevlerini direkt olarak iyileştirerek bağırsak savunmasını arttıırırlar. Probiotikler mukozal IgA sekresyonu, yangı, epitelyal hücre çoğalması, apoptoz ve bağırsak geçirgenliğini içeren birçok bağırsak savunma mekanizmasını düzenlemektedir (181). Probiotik suplementasyonu çok düşük doğum ağırlıklı infantlarda NEK'ten korunmada kullanılmaktadır (182). Çok düşük doğum ağırlıklı infantlarda probiotik kolonizasyonu anormaldir ve birçok biyolojik mekanizma ile pro-enflammatuar sinyallerde ve hastalıkta rol almaktadır (183). NEK'ten korunmada probiotik profilaksisinin etkili olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Akisü ve ark (184) yaptıkları deneysel çalışmada yavru farelere oral olarak probiyotik bir ajan olan *Saccharomyces boulardii* vermişler, kontrol grubuna göre bu farelerde bağırsak hasarının daha az oluştuğunu, bağırsak hasarında major rol oynayan PAF düzeylerinin daha düşük olduğunu saptamışlardır. Ancak optimal kombinasyon ve doz belli değildir. Bazı durumlarda probiotik suplementasyonu sepsise yol açabilmektedir.

Prebiotikler diyete ek olarak verilen, sindirilemeyen karbonhidrat ya da musinlerdir. Prebiotikler yararlı komensal bakterilerin çoğalmasını uyararak bağırsak sağlığını iyileştirmektedir (185). Prematüre bebeklerde prebiotik içeren mamalar (%90 kısa zincirli galakto-oligosakkarid, %10 uzun zincirli frukto-oligosakkarid) dışkı kolonizasyon paternlerini Bifidiobacterium büyümesini arttırarak ve patojenlerin büyümesini azaltarak sağlamaktadır (186).

Postbiotikler komensal bakteriler tarafından üretilen metabolitlerdir ve biyolojik olarak etki gösterirler. En sık çalışılan kısa zincirli yağ asidi olan bütirik asid'dir. Bütirik asid kolonik enterositler için major enerji kaynağıdır. Bağırsak büyüme ve diferansiasyonunda düzenleyici rol oynamaktadır (187). Bütirik asid'in yenidoğanlar üzerine olan etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

I.Gastrik asid supresyonu: Prematüre bebeklerde gastrik asid supresyonunda H₂-bloker kullanılması NEK ve nazokomial infeksiyon riskinde artışa neden olmaktadır (188). Gastrik asid, NEK'e yol açan infeksiyöz ve yangısal kaskadların önlenmesinde rol alabilir. H₂-blokerlerin kullanımında bu nedenle dikkatli karar verilmelidir (189).

2.9. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE OKSİDAN HASAR

2.9.1 Oksidan Hasar: İskemik zedelenme sonrası reperfüzyon ve reoksijenizasyon ile ortamda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O^-) ve hidroksil anyonu (OH^-) en önemli ve hasardan sorumlu serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Bu serbest oksijen radikalleri lokal hasar gelişimi ve sistemik bulgulardan sorumlu olabilir. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve DNA hasarı oluşturarak hücre ölümüne (apoptosis) neden olurlar (119). Prematürlerde herhangi bir nedenle oluşan hipoksi-reoksijenizasyon sürecinde gelişebilecek olan bağırsak mukoza hasarlanmasından koruyucu olan antioksidan sistemler yetersizdir. Deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde bağırsak hasarı ve NEK gelişiminin azaldığı saptanmıştır. Miller ve ark (190) yaptıkları çalışmada deneysel superoksit dismutaz (SOD) uygulamasının gastrointestinal sistemdeki hasarlanmayı azalttığını, yine Cueva ve ark (191) deneysel olarak SOD ve katalaz verdikleri hayvanlarda PAF ile ilişkili NEK gelişiminin azaldığını göstermişlerdir. Hipoksi ve reoksijenizasyon sonrası serbest oksijen radikalleri yoluyla oluşan lipid peroksidasyonu dokuda thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nötrofil aktivitesi ise dokuda myelopereksidaz (MPO) düzeylerinin ölçümü ile kantitatif olarak saptanabilir. Daha önceki çalışmalarda hipoksi ve reoksijenizasyon ile geliştirilen deneysel NEK modelinde barsak dokusunda TBARS ve MPO düzeylerinin kontrollere göre anlamlı oranda arttığı saptanmıştır (192).

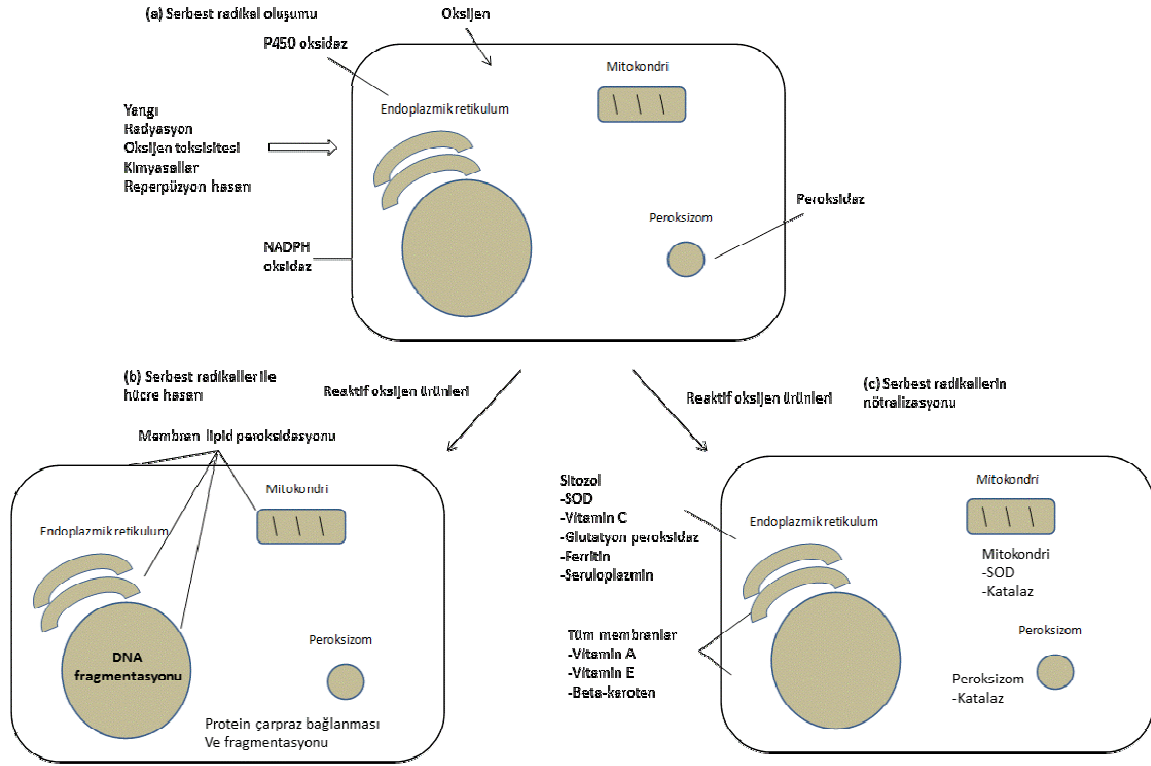
2.9.2. Antioksidan Sistem: Normal koşullar altında, reaktif oksijen ürünleri üretimi ile hücreleri in vivo koruyan anti-oksidan savunma sistemleri arasında ince bir denge vardır. Hipoksi, reperfüzyon ya da yangıyı içeren yenidoğanı etkileyen birçok durum artmış reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkması ile ilişkilidir. Aynı zamanda reaktif oksijen ürünleri yetersiz antioksidan savunma sistemleri sonucunda da ortaya çıkabilir. Antioksidan kapasite doğumda yetersiz olabilir. Çünkü antioksidan kapasitesindeki gelişimsel artışlar (materno-fetal plasental geçiş, endojen üretim) uterus dışı yaşama hazırlık olarak ilerleyen gestasyonel haftalarda ortaya çıkar. Ayrıca, yenidoğanlarda hiperoksi ya da oksidan strese karşı antioksidanların yapımını arttırma yeteneği yetersizdir. Antioksidan enzimlerin induksiyonundaki yetersizlik

yenidoğanda oksijen radikal hastalıklarının gelişimi riskini artırır (193). Deneysel hayvan akciğerlerinde geç gestasyonel haftalarda antioksidan enzim SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gelişimi gösterilmiştir (194). SOD'un bilinen tek işlevi çok reaktif olan superoksid radikallerini hidrojen peroksid ve suya çevirmektir. Ardından katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz hidrojen peroksidi suya çevirir. Tablo 4'te reaktif oksijen ürünleri ve antioksidanlar görülmektedir.

Tablo 4: Reaktif oksijen ürünleri ve antioksidanlar

Radikal	Sembol	Antioksidan
Superoksid anyon	O_2^-	Superoksid dismutaz, ürik asid, vitamin E
Tek oksijen	1O_2	Beta-karoten, ürik asid, vitamine E
Hidrojen peroksid	H_2O_2	Katalaz, glutatyon, peroksidaz
Hidroksil radikali	OH^-	Vitamin C ve E
Peroksid radikali	LOO^-	Vitamin C ve E
Hidroperoksil radikali	$LOOH$	Glutatyon transferaz, glutatyon peroksidaz

Gebeliğin ilerlemesi boyunca antioksidan enzim ekspresyonu birçok fetal kompartmanda artar. SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz aktivitelerinin arttığı insan fetal ve plasental dokularında lipid peroksidasyonunun azalması ile kanıtlanmıştır (195). Doğum ciddi bir oksidatif stres oluşturmaktadır (196). Prematür doğum antioksidan sistemlerindeki normal artış ve reaktif oksijen ürünlerini yakalayan glutatyon ve seruloplazmindeki artış olmadan ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda antioksidan savunma için önemli besin maddelerinin uteruplasental taşınmasında eksiklik vardır (197). MnSOD RNA spontan doğum eylemi ve koryoamnionit varlığında fetal membranlarda indükte olmaktadır (198). Erken doğum tehditinde antenatal kortikosteroidler akciğer maturasyonunu artırma yanında SOD, katalaz ve glutatyon-S transferaz aktivitesinde artış oluşturmaktadır (199) (Şekil 6). Bu durum preterm doğuma bağlı relatif antioksidan eksikliğini telafi eder.



Şekil 6: Serbest radikal oluşumu, hücre hasarı ve nötralizasyonu (200) (SOD: Süperoksit dismutaz, NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)

Oksidatif stres tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, prematür membran rüptürü, intrauterin büyüme geriliği ve fetal ölüm gibi gebeliğe bağlı durumlarda neden olarak düşünülmüştür (201). İn utero ortaya çıkan stres faktörleri reaktif oksijen ürünleri oluşumuna ve doku hasarına neden olur. Proteine bağlı olmayan demir gibi oksidatif stres belirteçleri intrauterin reaktif oksijen ürünlerinin üretimlerinin belirteci olarak kord kanında bakılmıştır. Bu belirteçler birçok postnatal hastalık süreci gelişimi ile ilişkili bulunmuştur ve özellikle prematür bebeklerde in utero oksidatif stresin önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur (202). Enzimatik ya da non-enzimatik antioksidanların suplementasyonu oksijen ürünlerinin fazla oluşumuna bağlı hasarı azaltmak açısından özellikle bronkopulmoner displazi, prematüre retinopatisi, periventriküler lökomalazi ve nekrotizan enteroklit hastalıklarında kullanılabilir. NEK etyolojisi multifaktöriyel olmasına karşın yangı ve reaktif oksijen ürünlerinin üretimi önemli rol oynamaktadır. Koryoamnionit olan annelerden doğan bebeklerde artmış NEK insidansı saptanmıştır (203).

Bu bulgu prematüre bebekte prenatal enfeksiyon/yanğı'nın bağırsakta NEK gelişimine yatkınlık yaratacağını ortaya koymuştur. Yenidoğan sıçan modelinde yapılan bir çalışmada, lipopolisakkarid verilmesi bağırsak hasarına artmış yatkınlık oluşturmuştur. Bağırsak hasarındaki bu artış kısmen iNOS tarafından oluşturulmakta ve selektif iNOS inhibitörü aminoguanidin tarafından azaltılmaktadır (204). Hedef olarak iNOS ve iNOS'tan oluşan nitrik oksidi hedef olarak seçme NEK önlenmesinde tedavi edici bir yaklaşım olabilir. Juvenil sıçan modellerinde tek başına ya da arginin ile birlikte enteral glutamin'in oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Bu sadece hipoksi-reoksijenizasyonda değil sağlıklı yenidoğan sıçanlarda da oluşmaktadır (205).

2.10. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE İNFLAMATUVAR SİTOKİNLER

NEK patogenezinde birçok yangısal mediatör rol almaktadır. Hipoksi ve reperfüzyon ile gelişen bağırsak hasarı sonucu çeşitli yangısal mediatörler ortama salınır. Hasarlanan epitelyal hücrelerden ve aktive nötrofillerden salınan bu mediyatörlerin başlıcaları; PAF, TNF- α , NO, IL-6 dır. Yapılan bir çok çalışma NEK de bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında primer rol oynadığı saptanmıştır (206).

Tümör nekroz faktör alfa ile NEK arasında ilişki vardır. TNF- α ve lipopolisakkaridlerin intravenöz yolla birlikte verilmesi hayvan modellerinde şok ve ciddi bağırsak nekrozuna yol açmaktadır ve TNF- α verilmesi NEK patogenezinde önemli rol oynayan PAF üretimine yol açmaktadır (207). NEK gelişen yenidoğanlarda plazma TNF- α düzeyi kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuştur (208). TNF- α üretimini inhibe eden pentoksifilin yenidoğan sıçan modelinde intraperitoneal enjeksiyon ile NEK insidansını azaltmıştır (209) ve erişkin sıçan iskemi-reperfüzyon modelinde bağırsak hasarını azaltmıştır (210). İki ayrı çalışmada intraperitoneal TNF- α antikorunu kullanılarak yenidoğan sıçanlarda NEK şiddetinde azalma bildirmişlerdir (211,212).

Ren ve ark (213) çalışmasında evre II NEK olguları, imperfore anus ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır. NEK olgularında makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), IL-6 ve IL-8 anlamlı olarak yükselmiş bulunmuştur. MIF, IL-6 ve IL-8 üretimini uyarmaktadır. Nanthakumar ve ark (214) in vitro çalışmasında fetal bağırsak hücreleri lipopolisakkarid ve IL-1 β 'ya matür enterositler ile karşılaştırıldığında çok fazla IL-8 üretimi ile yanıt vermektedir. Edelson ve ark (215) çalışmasında evre III NEK olgularında IL-8 düzeyinin yanında anti-iflamatuvar olan IL-10 ve IL-1ra düzeylerinde arttığı saptanmıştır.

2.11. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE TOLL-LİKE RESEPTÖR (TLR)

TLR mikroorganizmalar üzerinde bulunan ve yapısal olarak korunmuş olan molekülleri tanıyan reseptörleridir. İyi karakterize edilmiş 10 üzerinde TLR vardır ve özel ligandlara karşı anlamlı spesifiteleri bulunmaktadır. Örneğin gram negatif bakteri hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid TLR4 için ana ligandır. TLR aktivasyonu sonrası kompleks sinyal iletim kaskadı ortaya çıkar ve NFκB translokasyonu ile sonuçlanır. NFκB nükleus için proinflamatuvar transkripsiyon faktörüdür ve yangısal sitokinlerin salınımına yol açar (216). TLR birçok hücre serisinde bulunmasına karşın ekspresyonları dokuya göre değişir. Yangısal hücreler tipik olarak bu reseptörleri yüksek düzeyde eksprese ederler. Bağırsak epitelyum hücreleri TLR4 ve TLR2 reseptörlerini düşük düzeyde eksprese ederler ve bu yüzden komensal bakterilere karşı yanıtızlık vardır (217,218). Bağırsak lumeninde epitelyal hücreler sürekli olarak bakterial ürünlere maruz kalmalarına karşın TLR reseptörleri downregulasyonuna bağlı yangısal olay sınırlıdır (219). TLR reseptörlerinin bu işleyişi gelişimsel olarak düzenlenmektedir ve bu işlevde ortaya çıkan aksamalar yangısal yanıt ve NEK oluşturabilir. Fetal bağırsak hücrelerinin lipopolisakkaridlere yanıt verdiği ancak bu yanıtın doğum sonrası ortadan kalktığı gösterilmiştir (220).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda TLR'nin NEK patofizyolojisinde önemli rol oynadığı bulunmuştur. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda anne sütü ile beslenen hayvanlarda bağırsak epiteline TLR4 ekspresyonunun geçici olarak azaldığı ve mama ile beslenen ve asfiksi stresi uygulanan hayvanlarda TLR4 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu anormal TLR4 artışı iNOS düzeylerinde artış oluşturmaktadır (116). Bir diğer çalışmada TLR4 ekspresyonundaki bozulmanın enterosit apoptozunu arttırdığı ve bağırsak epitelinin onarım kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (117).

2.12. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE POLİ(ADP-RİBOZ) POLİMERAZ (PARP)

Oksidatif DNA hasarı oluştuktan sonra poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) enzimi DNA onarımını kolaylaştırmaktadır. Bu enzim nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'yı substrat olarak kullanarak çok sayıda ADP-riboz (PAR) unitelerini kendisine ve diğer akseptör proteinlere bağlar (221, 222). Bu çok sayıda PAR ünitesinin eklenmesi akseptör proteinlerin DNA onarımını etkileyen önemli hücresel yanıtları etkilemesine yol açar (223).

Ancak ciddi hücrel oksidatif stres ve DNA hasarı varlığında PARP-1 fazla aktivasyonu ortaya çıkabilir. Bu durumda iki olası mekanizma ile hücre ölümü ortaya çıkar:

1. Ciddi PARP-1 aktivasyonu hücredeki NAD⁺/ATP tükenmesine yol açarak metabolik yolla hücre ölümüne neden olur (224). Kriptlerde çoğalan enterositler ya da villusta apoptoza giden hücreler gibi zaten NAD⁺ düzeyi az olan hücreler bu hasara daha çok yatkındırlar (225).
2. Yeterli hücre enerji deposu olması durumunda artmış PARP-1 aktivasyonu apoptoza mitokondride yer alan apoptotik uyarıcı faktör (AIF) ya da kaspaz-bağımlı mekanizmalar ile yol açar (226). Yapılan çalışmalarda sıçan NEK modellerinde PARP-1 ekspresyonunun arttığı ve PARP-1 inhibitörlerinin hasarı azalttığı gösterilmiştir.

2.13. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE APOPTOZ

2.13.1. Apoptoz: Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz; travma, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise organizmanın gereksinim duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz ve apoptoz birbirinden ayırt edilmelidir (227). (Tablo 5).

Tablo 5: Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması

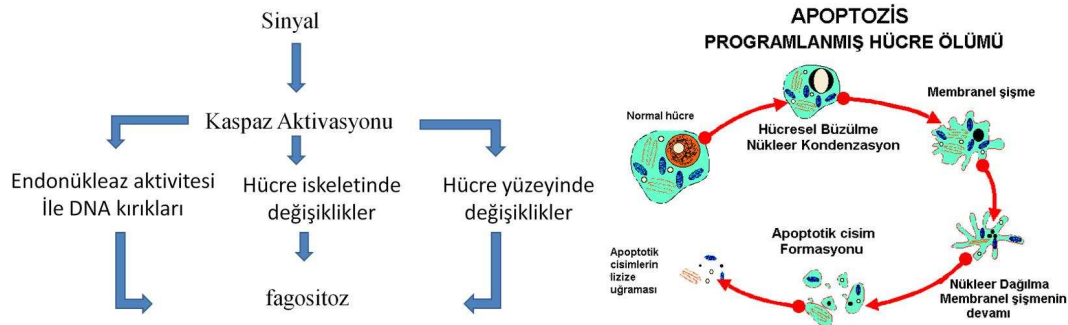
	Apoptoz	Nekroz
Hücre	Büzüşür	Şişer
DNA	İnternükleozomal yarıma	Degradasyon
Kromatin	Düzenli bir şekilde yoğunlaşma	Anormal çökme
Çekirdek	Kromatin kenarda toplanır	Piknoz (küçülür)
Membran devamlılığı	Son zamana kadar korunur Zarda kabarcıklar vardır	Erken dönemde bozulur
Lizozomlar	Sağlamdır	Bozulur
Mitokondri	İnce yapısı normal	Şişer, Ca ²⁺ içeri girer
Yangısal değişiklikler	Yok	Var
Patern	Tek tek hücreler etkilenir	Hücreler grup halinde etkilenir
Hücre hacmi	Azalıp	Erkenden artar
Hücre parçalanması	Apoptotik cisimcikler var	Hücre eriyip yok olur

Apoptotik hücre ölümünün aşamaları hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini izleyen olaylar zinciri olarak devam eder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar:

1. Apoptozun başlatılması
2. Hücre içi proteazların (kaspazlar) aktivasyonu
3. Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler oluşması
4. Fagositoz olarak sayılabilir (228) (Şekil 7).

Apoptoz sırasında hücre içi ve dışından gelen sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz (caspase = cystein containing aspartate specific proteases) denir. İnsan vücudunda 10'dan fazla kaspaz saptanmıştır. Sağlıklı hücrelerde kaspazlar enzimatik olarak inaktiftir ve aktif forma göre daha uzun polipeptid zincir olarak bulunurlar. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, BAX, BAK, Bcl-xS gibi). Bunlardan bir kısmı antiapoptotik, bir kısmı ise proapoptotiktir.

Kaspazların en önemlilerinden biri olan kaspaz-3, apoptozda merkezi rol oynar. Pek çok çalışmada aktive kaspaz-3 düzeyinin tayini apoptoz göstergesi olarak kullanılmaktadır (229). Daha önceki çalışmalar böbrek ve santal sinir sisteminde hipoksi reoksijenasyon (H/R) ile uyarılmış hasarda apoptozun temel hücre ölüm mekanizması olduğu, H/R öncesi verilen spesifik kaspaz inhibitörleri ile apoptozun önlenildiği gösterilmiştir (230).



Şekil 7: Hücre içi ve dışından gelen sinyallerle başlayan apoptoz aşamaları ve hücre içinde meydana gelen değişiklikler

2.13.2. Apoptoz ve Bağırsak Sistemi

Apoptoz insan vücudunda gastrointestinal sisteminin de içinde olduğu birçok dokuda meydana gelir. İskemi ile birlikte reperfüzyona uğrayan dokularda hücre ölümü nekroz ve apoptoz ile olur. Daha önceki yıllarda hücre ölümünün sadece nekroz yoluyla olduğu bilinirdi. Son 20 yılda apoptoz hakkındaki bilgilerin hızla artması sonucu apoptozun da hasarlanmış hücre ölümünde temel yollardan biri olduğu anlaşılmıştır. Çalışmalarda iskemi ve/veya H/R sonrası beyin (231), kalp (232) ve karaciğerde (233) temel hücre hasarlanması mekanizmasının apoptoz olduğu anlaşılmıştır. İskemi-reperfüzyon ilişkili apoptozun sadece bu organlarda olmadığı gastrointestinal sistemi de içini alan birçok dokuda meydana geldiği gösterilmiştir (234-237).

Hipoksi ve reperfüzyon ile ilişkili bağırsak hasarında apoptozun gelişim basamakları tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda bağırsak sisteminde programlanmış hücre ölümünün serbest oksijen radikalleri ve aktive lökositlerle başladığı, antioksidan maddeler ve lökositlerin aktivitesini önleyen sitokinlerin verilmesi ile apoptozun belirgin oranda azaldığı gösterilmiştir. Noda ve ark (234) ve Kojima ve ark (235) yaptıkları çalışmalarda sıçanlarda oluşturulan deneysel bağırsak iskemisi ile bağırsakta apoptozun arttığını göstermişlerdir. Kojima ve ark (238) (yaptıkları başka bir çalışmada) antioksidan maddeler olan nebamipide ve dimetilsülfoksit uygulanan farelerde oluşturulan iskemi sonrası apoptozun belirgin oranda azaldığını ortaya koymuşlardır. Lökositlerin aktivitesini önleyen IL-11 ile ön tedavi yapılan farelerde bağırsak sisteminde apoptoz ve nekrozun azaldığı gösterilmiştir (239).

2.13.3. Apoptozun TUNEL Yöntemi ile Gösterilmesi:

Apoptotik hücreleri saptamada kullanılan histolojik yöntemlerin çoğu hücre çekirdeği düzeyinde oluşan morfolojik değişiklikleri esas alır. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ise morfolojik değişiklikler görünür hale gelmeden önce oluşan DNA kırıklarını gösterebilir. TUNEL, çekirdekdeki DNA kırıklarını direkt ve spesifik işaretleyen bir yöntemdir. Bu teknik in situ olarak DNA kırıklarının çekirdekte işaretlenmesidir.

Terminal deoksineükleotidil transferazın (Tdt) DNA'nın polideoksinükleotid polimerlerinin sentezi ile oluşan 3'OH ucuna spesifik bağlanması esasına dayanır. TUNEL sadece programlanmış hücre ölümünün in situ tanısında kullanışlı bir yöntem olarak kalmaz, bu yöntem hücre topluluklarında sürecin miktarını ölçmede ve sayısallaştırmada da işe yarar (240).

2.14. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE NÖTROFİL

İnflamasyon NEK olgularından elde edilen bağırsak materyallerinde gösterilen major histolojik özelliktir ve bağırsak materyallerinin %78'inde nötrofil infiltrasyonunun baskın olduğu akut inflamasyon bulunmaktadır. İnflamatuvar yanıtın oluşumu doku hasarı ve bağırsakta ortaya çıkan bakteri çoğalmasına karşı uygun bir yanıttır, ancak bu inflamasyon sonucu ortaya çıkan mediatörler NEK patogenezinde önemli rol almaktadır. Aktive nötrofiller elastaz, gelatinaz, kollegenazı içeren birçok proteolitik enzim ve reaktif oksijen ürünleri salgılamaktadır. Bu ürünler nötrofillerin transepitelyal migrasyonunu ve bakteri öldürmesini sağlamaktadır. Bu olay fazla miktarda konak doku hasarına yol açabilir ve bağırsaktaki nötrofil infiltrasyonu NEK'te ortaya çıkan doku hasarına katkıda bulunabilir (241). Bu durum deneysel modelde nötrofenik sıçanlarda bağırsak hasarının azalması ile gösterilmiştir (242).

2.15. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT VE KİTOTRİOZİDAZ

Kitin, (b-1,4 bağlı N-asetilglukozamin polimeri) dünyada selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkariddir. Kitin, birçok canlı türünün kabuğunda (birçok fungusun hücre duvarında, parazitik nematodların mikrofilarial kabuğunda), birçok böceğin sindirim kanalının duvarında yapısal eleman olarak bulunur (243).

İnsan vücudunda yapısal eleman olarak kitin bulunmaz ve kitini sentez veya metabolize ettiğine dair herhangi bir bilginiz yoktur (244). Doğal olarak kitinaz enziminin de bulunmaması beklenirse de ilginç olarak insan genomunda kitinaz ve benzeri proteinleri kodlayan GH18 ailesine ait 8 adet gen bulunmuştur. İlk kez, 1994'de Hollak ve arkadaşları (245) yakınması olan Gaucher hastalarının plazmalarında aşırı artmış (100-1000 kat) kitinaz aktivitesi saptamışlar ve bu kitinaza, sentetik substrat kitotrioz'a da etki etmesi nedeniyle "kitotriozidaz" adını vermişlerdir. İnsanlardaki GH18 ailesindeki 8 proteinden 3 tanesinin enzim aktivitesi (kitinaz)

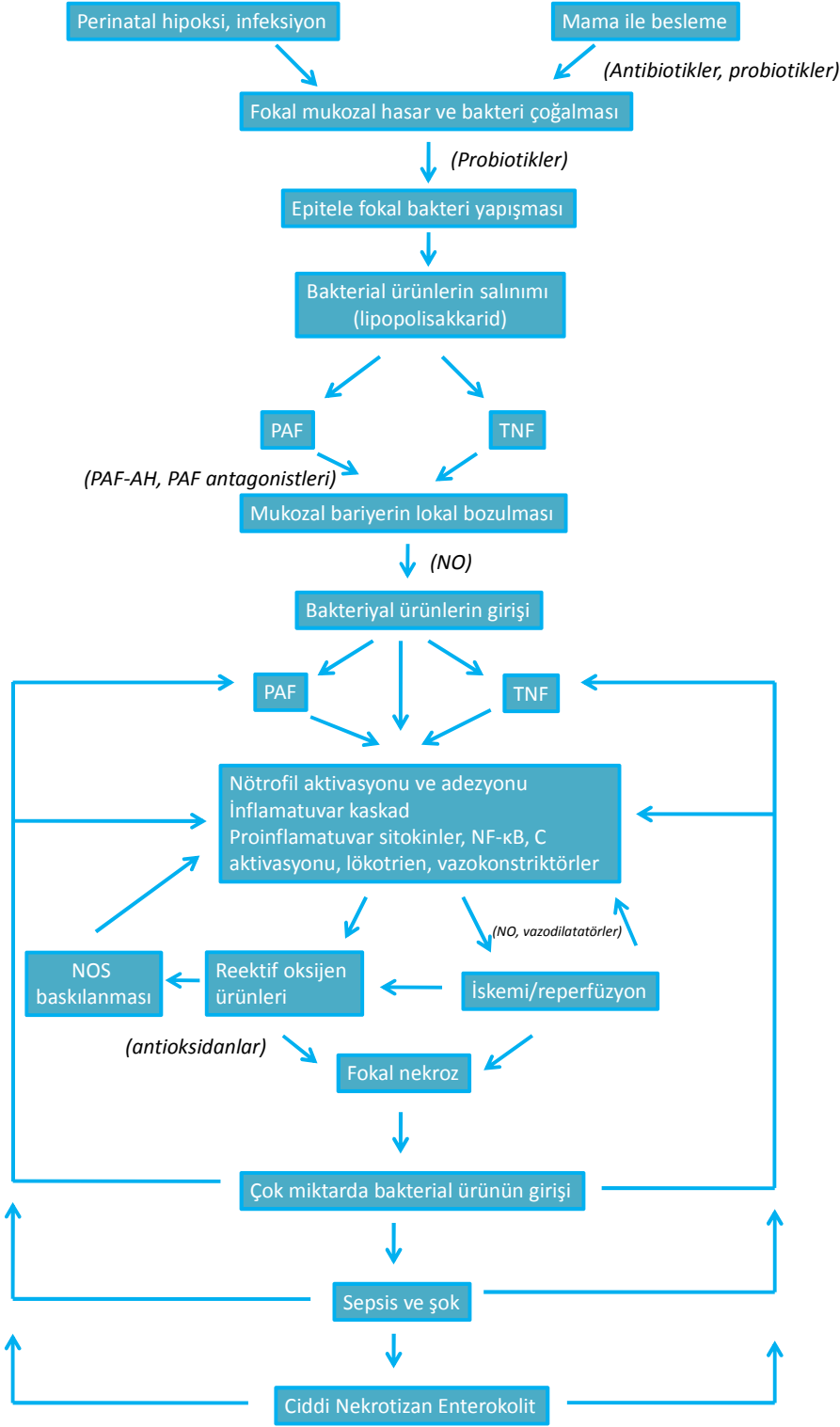
vardır. Bunlar a-) aktiflenmiş makrofajlarda depolanan ve sekrete edilen ve fungostatik etkisi olduğu belirlenen kitotriozidaz, b-) daha çok gastrointestinal kanal ve akciğerlerde eksprese olan ve doğal immünite ve besinlerin sindiriminde rol aldığı ileri sürülen asidik memeli kitinaz (AMCase) c-) kitin yanında asparajinle bağlanmış glikoproteinlerin lizozomal yıkımında rol alan di-N-asetilkitobiaz. Kitotriozidaz özellikleri ilk tanımlanan memeli kitinazdır.

Kitotriozidaz aktivitesi karaciğer, böbrekler, dalak, akciğerler ve kemik iliğinde saptanmışsa da baslıca makrofajlar tarafından çeşitli uyarılara (prolaktin, TNF- α , gama-interferon, lipopolisakkarit gibi) cevaben aşırı kitotriozidaz sentez ve salınımı olmaktadır (246). Kitotriozidaz monositlerde yoktur fakat matür insan makrofajlarında eksprese olur. Sağlıklı bireylerin kanında kitotriozidaz'ın ana kaynağı, lenfositler ve monositler değil, insan polimorf nüveli nötrofil (PMN)'leridir. Enzim, bu hücrelerde 50 kDa'luk Kitotriozidaz formu halinde sentezlenir ve özel granüllerde depolanır. İn vitro şartlarda, granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktörün (GM-CSF) insan PMN'lerinden kitotriozidaz salınımını arttırdığı saptanmıştır. Bu, daha sonra GM-CSF tatbik edilen sağlıklı bireylerin seri plazma örneklerinin analizi ile de doğrulanmıştır. GM-CSF makrofajlarda da, kitotriozidaz ekspresyonunu artırır (247).

Kitotriozidaz enzimi inflamatuvar bir protein olarak düşünülebilir. Fakat üretimi, hücre kültüründe uyarımdan en az 1 hafta sonra olur ve zamanla artar. Bu nedenle, bir akut reaktif proteinden çok kronik bir inflamatuvar belirteç olarak kabul edilebilir (248).

Madazli ve ark (249) pre-eklamptik gebelerde, kitotriozidaz aktivitesini maternal ve kord serumunda, normallere göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Şekil 8'de genel olarak NEK patogenezi ve tedavisi gösterilmiştir.



Şekil 8: Nekrotizan enterokolit patogenezi ve tedavisi (PAF: Platelet aktive edici faktör, PAF-AH: PAF asetil hidroksilaz, TNF: tümör nekroz faktör, NO: nitrik oksid)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEYSEL GEREÇ

- Fare (15-20 günlük, ağırlıkları 10-20 gr arasında olan yavru Balb/c)
- Deney kafesi (19x12x12 cm)
- Hassas terazi (Precia XB-220A)
- Serum Fizyolojik
- Enjektör, insulin enjektörü
- Anestezik madde (Ketamin, Ksilazin-Rompun®, eter)
- Oksijen tüpü, karbonmonoksit tüpü
- Hava geçirmeyen Plexiglas chamber
- 11 nolu bistüri, ekartör, forseps, klemp ve mikromakas
- Giemza boyası (% 5 lik mikroskopik boya solüsyonu)
- Lam-Lamel (Menzel- Glose Polysine-25x 75x 1 mm & Surgipath Precleaned Adhesive 00210 White, Unilab Lamel 24x 50 mm)
- Eppendorf kapaklı tüp
- Kapaklı cam tüp
- EDTA'lı hemogram tüpü
- Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF)-(Neupogen®/Filgrastim)
- Siklofosamid (Endoxan®)

3.2.DENEY HAYVANLARI

Bu deneysel çalışmada 15-20 günlük ve ağırlıkları 10-20 gr arasında olan yavru Balb/c fareleri kullanıldı. Hayvanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezinden sağlandı. Çalışma süresince hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde (19x12x12 cm) tutuldu. Herbirinde 7 fare olacak şekilde yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23-24°C'de tutularak hayvanların normotermik olmaları sağlandı. Tüm hayvanlar standart fare yemi (pellet yem, TARIŞ) ile beslendi. Yem ve su günlük olarak değiştirildi.

Sunulan tez çalışmalarında kullanılan deney protokolleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulunca onaylanmış olup, deney hayvanlarının maruz bırakıldıkları tüm işlemler Avrupa Birliği Konseyi Direktifleri (86/609/EEC) ile uyumludur.

3.3. DENEY GRUPLARI

Bu çalışmada 5 grup planlanmıştır (Şekil 9).

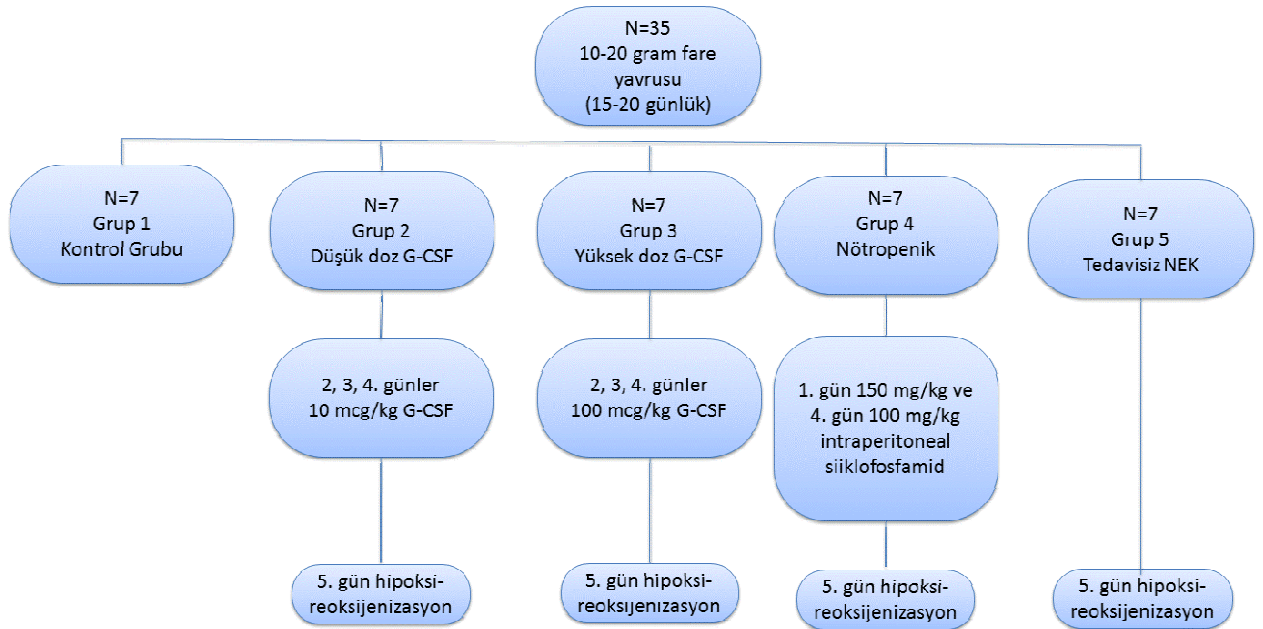
Grup 1: Kontrol grubu (7 fare yavrusu)

Grup 2: Klasik doz (10 mcg/kg) G-CSF (7 fare yavrusu)

Grup 3: Yüksek doz (100 mcg/kg) G-CSF (7 fare yavrusu)

Grup 4: Nötropenik grup (7 fare yavrusu)

Grup 5: Tedavisiz NEK grubu (7 fare yavrusu)



Şekil 9: Çalışma gruplarının dağılımı

3.4.DENEYSEL YÖNTEM

3.4.1.Nötropeni Modeli

Bu çalışmada nötropeni modeli için siklofosfamid kullanıldı. Düşük doz siklofosfamid (250mg/kg) protokolu uygulandı.

Bir gr siklofosfamid (Endoxan®) önce 50 cc çözelti solusyonunda eritildi ve ardından 50 cc serum fizyolojik ile karıştırılarak 100 cc solusyonda 1 gr siklofosfamid olması sağlandı. İlacın hazırlanması çeker ocak altında yapıldı. NEK modeli oluşturmadan önce, 1. gün 150 mg/kg siklofosfamid ve 4. gün 100 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal olarak uygulandı. Fareler her uygulamadan önce tartılarak dozları ayarlandı. NEK modeli oluşturulduğu dönemde sıçan yavrularının nötropenik dönemde olması sağlandı.

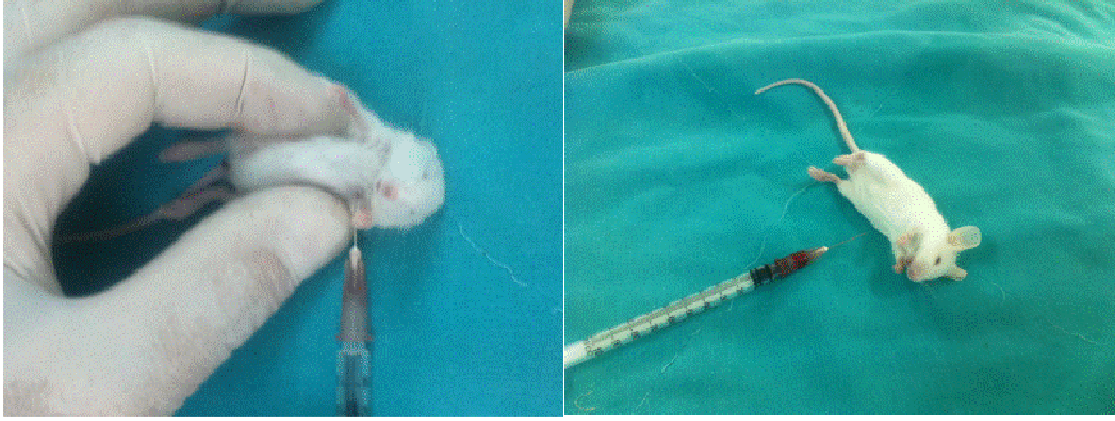
3.4.2.Nötrofili Modeli (Lökositöz)

Granülosit koloni stimüle edici faktör, 18.8-kDa glikoproteindir. Spesifik reseptörüne (G-CSF-Rs) bağlanarak nötrofil üretiminin düzenlenmesinde rol almaktadır. G-CSF spesifik reseptörüne bağlanarak granülositik prekürsörlerin apoptozunu inhibe etmekte, klonal proliferasyon ve diferansiasyonlarını desteklemektedir.

NEK modeli oluşturmadan önce, 3 gün süre ile bir gruba 10 mcg/kg, diğer gruba 100 mcg/kg intraperitoneal olarak G-CSF uygulandı. NEK modeli oluşturulduğu dönemde lökosit ve nötrofil sayıları belirlendi. Düşük doz için, 300mcg G-CSF (Neupogen®/Filgrastim) 150 cc, yüksek doz için 300 mcg 15 cc serum fizyolojik ile sulandırıldı ve fareler her uygulamadan önce tartılarak dozları ayarlandı.

3.4.3.Lökosit ve Nötrofil Düzeyinin Saptanması

Olgulardan sakrifikasyon öncesinde intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri EDTA'lı tüpe konuldu ve periferik yaymaları yapıldı (Resim 1). Lökosit sayıları cihazda sayıldı. Periferik yayma Giemza boyası ile boyanarak mikroskopi altında hücre dağılımı belirlendi.



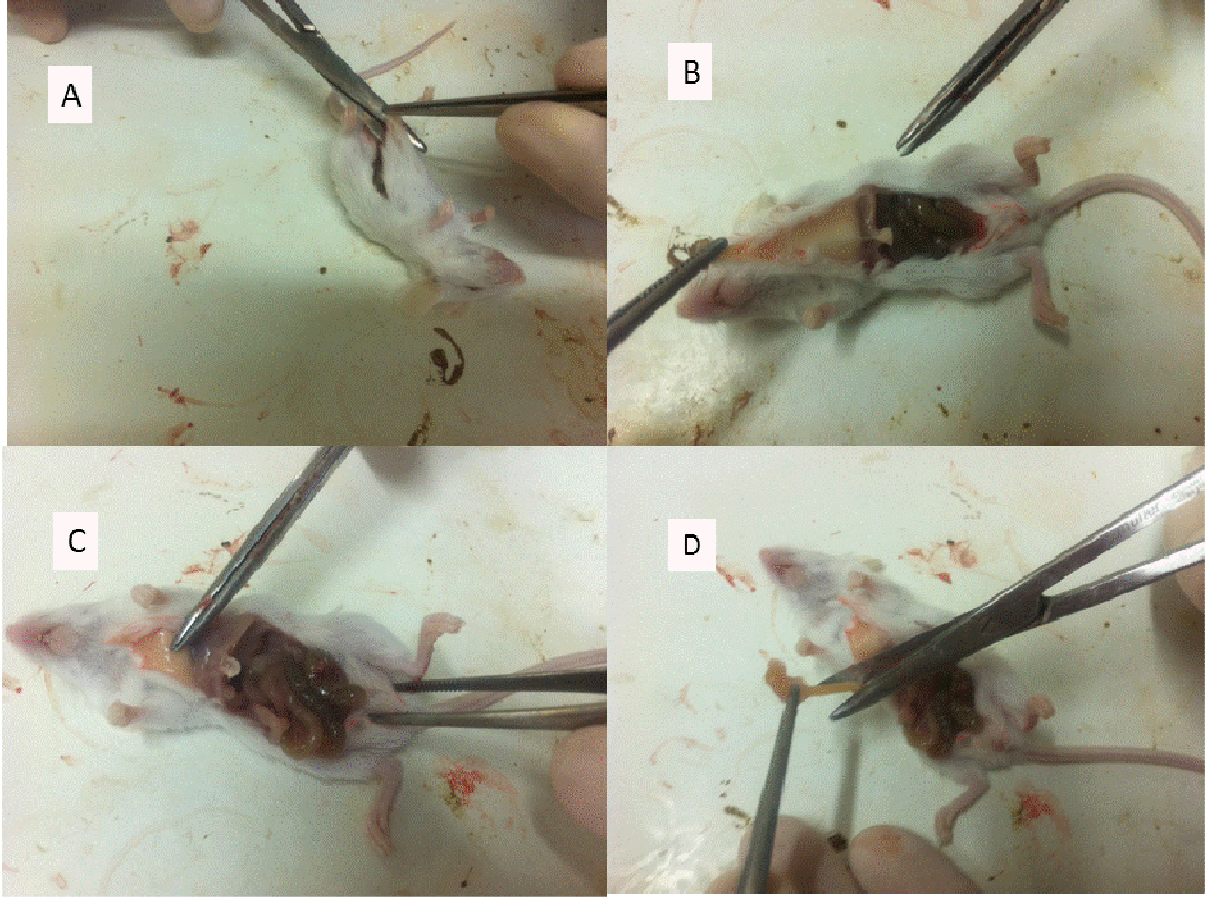
Resim 1: İnttrakardiak kan alınması işlemi

3.4.4.Nekrotizan enterokolit modeli

Tedaviler sonrası, hipoksi-reoksijenizasyon modeli ile uygulandı. Çalışmanın 5. gününde yavru fareler hava geçirmeyen Plexiglas chamber içine yerleştirildi. Hipoksi için yavrulara %100 karbondioksit 5 dakika süre ile uygulandı. Tüm hayvanların bu periyod sonunda siyanotik oldukları, gasping yaptıkları ve dışkılamalarının olduğu gözlemlendi. Hipoksi sonrası yavru farelere 10 dakika süre ile %100 oksijen solutularak reoksijenizasyon sağlandı. Reoksijenizasyon sonrası fareler tekrar kafeslerine alındı ve hayvanlar H/R sonrası 4. saatte servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Yavru fareler sakrifiye edildikten hemen sonra karınları açılarak intestinal hasarlanma kanıtları değerlendirildi (Resim 2). Barsaklar diseke edilerek ayrıldı ve serum fizyolojikle yıkandı. Eksize edilen barsak dokuları 1-2 cm uzunluğunda parçalar halinde histolojik çalışma için %4 formaldehit solusyonu içeren tüplere konuldu. Fiksasyon için +4°C'de buzdolabında 48 sa at bekletildikten sonra tampon solusyonlara alındı.

Oksidan kapasite, sitokin, PARP, TLR4 yanıtının değerlendirilmesi için bağırsak parçaları serum fizyolojikle yıkandıktan sonra steril gazlı bez içinde kurulandı. Aliminyum folyo içine sarılarak, biyokimya laboratuvarında -80°C'de saklandı.



Resim 2: (A) Karın duvarına kesi yapılması, (B) karın duvarı flebinin kaldırılması, (C) karın duvarı flebi çıkarılması, (D) bağırsakların çıkarılması

Histolojik inceme yapılacak örnekler, fiksasyondan sonra parafin bloklara gömülerek kesitler alındı. Histolojik preparatlar Hematoksilen-Eozin, PAS, Sudan Black, Mallory Azan ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Histolojik olarak ışık mikroskobu düzeyinde görülen hasar; yok (-), hafif şiddette (+), orta şiddette (++), ağır hasar (+++), çok ağır hasar (++++) olacak şekilde sınıflandı. Patolojik inceleme çalışma gruplarını bilmeyen bir araştırmacı tarafından yapıldı. Alınan puanlar toplanarak toplam skor elde edildi. Mikroskopik hasar skorlaması Tablo 6'te gösterilmiştir.

Tablo 6: Mikroskopik hasar skorlaması

Epitel	Bulgu	Skor	Lamina propria	Bulgu	Skor
Ayrışma	Yok	0	Subepitelyel ödem	Yok	0
	+	1		+	1
	++	2		++	2
	+++	3		+++	3
	++++	4		++++	4
Dökülme	Yok	0	Hücrel infiltrasyon (nötrofil infiltrasyonu)	Yok	0
	+	1		+	1
	++	2		++	2
	+++	3		+++	3
	++++	4		++++	4
Küntleşme	Yok	0	Apoptoz	Yok	0
	Var	1		+	1
				++	2
				+++	3
				++++	4
Subepitelyel ayrışma (ödem)	Yok	0			
	+	1			
	++	2			
	+++	3			
	++++	4			
Mikrovillus hasarı	Yok	0			
	+	1			
	++	2			
	+++	3			
	++++	4			
Mitoz	Yok	0			
	+	1			
	++	2			
	+++	3			
	++++	4			
Salgı granülleri- bez dejenerasyonu	Yok	0			
	Var	1			

3.5. IŞIK MİKROSKOBU DOKU TAKİBİ VE BLOKLAMA

Parçalar %4 lük paraformaldehitte 48 saat süreyle bekletilerek fikse edildi.

- 24 saat PBS (**Tuzlu fosfat tamponu**) tamponunda bekletilerek yıkandı.
- 2 saat % 80 Etanolde,
- 3 saat % 95 Etanol I'de,
- 15 saat % 95 Etanol II'de,
- 2 saat % 100 Etanol I'de,
- 2 saat % 100 Etanol II'de
- 2 saat % 100 Etanol III' de bekletilerek dehidretasyon işlemi gerçekleştirildi.

Alkolden çıkarılan parçalar oda ısısında kurutuldu.

- Ksilol ile şeffaflandırma aşamasına geçildi.
- Şeffaflandırma aşaması sonrası 58°C etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletilerek, ertesi gün etüvden çıkarılıp erimiş beyaz parafine gömülerek bloklandı.

3.6. KESİT ALMA

- Işık mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotom kullanılarak 3-5µ'luk kesitler 37°C su banyosunda açılması sağlanarak rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lama yapışmaları sağlandı.
- Ksilolle parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.
- Uygun histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar için preparatlar hazır hale getirildi.

3.7.HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR

3.7.1.Hematoksilen Eosin Boyama Tekniği:

- Ksilol 10 dakika
- Ksilol 10 dakika
- Ksilol 10 dakika
- Kuruduktan sonra alkole geçirildi.
- % 100 Alkol ve 2. % 100 Alkol de 2' Şer dakika
- % 95 Alkol ve %80 alkolde 2'Şer dakika
- Distile suda 5 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 2,5 dakika tutuldu.
- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akar suda yıkandı.
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akar su 5 dakika
- Distile su 5 dakika yıkandı.
- Eozin 2,5 dakika
- % 95 Alkol , %100 Alkol ve 2. %100 Alkolde 2' Şer dakika bekletildi.
- DıŐarıda kurutuldu.
- Ksilolle muamele edildi.
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.

3.7.2. Periodic Acit Schiff (PAS) Boyama

- Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 5 µm lik örnek kesitler lam asansörüne yerleştirilerek 60°C lik etüvde 1 gece bekletildi.
- Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30' ar dakika 2 değişim ksilolde tutuldu.
- Rehidratasyon işlemi için, %95, %80, %70 etil alkol serilerinde 2'şer dakika tutuldu.
- Kesitler 5 dakika distile su ile yıkandı.
- Kesitler Periyodik asit solüsyonu içinde 5 dakika tutuldu.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler Schiff reaktifi içinde 15 dakika tutuldu.
- Kesitler akar su altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler Hematoksilen Gill 3 çözeltisi içinde 6 dakika tutuldu.
- Kesitler akar su altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarıldı.
- Kesitler akar su altında 10 dakika yıkandı.
- Kesitler 1 dakika %80 alkol içinde tutuldu.
- Kesitler 1 dakika %95 alkol içinde tutuldu.
- Kesitler 1 saat ksilolde tutuldu.
- Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.7.3. Mallory Azan (Bağ Dokusu) Boyama

- Sırasıyla; %100, %95, %70' lik etil alkolde 2' şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkandı.
- Bouin solüsyonunda (pikrit asit, formaldehit, glisiel asit) 56°C 1 saat etüvde bekletildi.
- Soğutulurak, musluk suyu ile yıkandı.
- Distile suya konuldu.
- % 5' lik asit fuksin solüsyonunda 1 dakika tutuldu.
- Anilin bloğunda 1saat yıkandı.
- Sırasıyla %95 ve %100' lük etil alkolde 1 dakika bekletildi.
- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5 dakika ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama: lamel ile kesitler kapatıldı.

3.7.4. Sudan Black Boyama:

- Sırasıyla; %100, %95, %85' lik etil alkolde 2' şer dakika bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dakika yıkandı.
- Sudan Black boyasında 10 dakika bekletildi.
- % 70 alkol ile yıkandı.
- Hematoksilen Gill 3 çözeltisinde 5 dakika tutuldu.
- Distile suya konuldu.
- Sırasıyla %95 ve %100' lük etil alkole batır- çıkar yapıldı.
- Kesitler kuruduktan sonra 15 dakika ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama: lamel ile kesitler kapatıldı.



Resim 3: Laboratuarda kullanılan teknik, boya ekipmanları ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme

3.7.5.TUNEL Boyama Protokolü

ApopTag^R Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (S7101-Millipore) kiti kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde;

- Equilibration Buffer
- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) enzimi
- Proteinase K
- Stop Wash Buffer
- DAB Dilution Buffer
- DAB Substrat Buffer
- Antidigoxigenin- peroksidaz
- Plastik preparat örtücü bulunur.

3.7.5.1.TUNEL yöntemi ile apoptozun değerlendirilmesi

Nükleustaki DNA fragmantasyonunu göstermek için parafin örnekler kit kullanılarak temial deoksinükleotidil transfereaz-ile oluşturulan etiketleme (TUNEL) reaksiyonu uygulandı. Deparafinizasyon sonrası örnekler 10 dakika %0.3 metanoldaki %3 H₂O₂ ve buz içinde 2 dakika %0.1 sodyum sitrat ve %0.1 tirtion X-100 uygulandı. Daha sonra örnekler 37°C'de 60 dakika süre ile TUNEL reaksiyonu karışımı ile entübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika diaminobenzidin solusyonu ile boyanıp karşıt boya olarak hematoksilen kullanıldı. Barsak kriptlerindeki apoptotik indeks en az 20 kript kullanılarak değerlendirildi. Tunel pozitif hücreler boyama yok(-), hafif şiddette boyama (+), orta şiddette boyama (++), kuvvetli boyama (+++), çok yoğun boyama (+++) olacak şekilde değerlendirildi.

3.8.LABORATUVAR GÖSTERGELERİ

3.8.1.Bağırsak Dokusu Thiobarbituric Acid-Reaktive Substances (TBARS) Ölçümü

TBARS tayini için kullanılan reaktifler:

Tiyobarbitürik asid (TBA)reaktifinin hazırlanması;

1.875 gr TBA, 12,5 ml HCl (%37), 75 cc triklorasetikasit (TCA) (%100)

Stok standart 1.1.1.3 tetraetoksipropanın 10 mM çözeltisi hazırlandı.

TBARS tayini için kullanılan yöntemin prensibi, homojenetin TCA deproteinize edilmesinin ardından örnekte bulunan TBA ile oluşturduğu TBA-MDA kompleksinin kırmızı renginin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Bağırsak doku homojenatındaki TBARS düzeyleri Ohkawa ve ark (250) metodu ile ölçüldü. Bağırsak dokusu soğuk buzda %1.15 lik KCL (1/10, doku/KCL, w/v) ile homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Sonraki işlemler için 0.4 ml örnek kullanıldı. Her örneğe 0.4 ml %8.1 sodyum dodesilsülfat ve 3 ml %20 asetik asit (pH=3.5) eklendi. Son olarak 3.0 ml %67'lik thiobarbiturat (TBA) solusyonu eklendi ve tüpler 1 saat kaynayan suya yerleştirildi. Test tüpleri soğuduktan sonra 1800 devir/dk hızda 10 dk santrifüje edildi. Distile su referans alınarak 532 nm dalga boyu spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

3.8.2.Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Ölçümü

MPO ölçümü için kullanılan reaktifler

MPO hexodectrimetil amonyum bromid (HETAB), 0- dianisidin, fosfat tampon: 0.1 M, PH=7,0

MPO aktiviteleri Şener ve ark (251) yöntemine göre saptandı. %0.5 heksadesiltrimetilamonyumbromide- HETAB- ve 0.01 M EDTA içeren 0.01 M fosfat solusyonu içindeki homojenizasyon sonrası örnekler 10.000 devir/dk da santrifüje edildi. Daha sonra örnekler O-fenilendiamin ve H₂O₂ ile karıştırıldı. Sonuçlar 30 sn-5 dk bir aralıkta 460 nm dalga boyunda değerlendirildi. MPO aktivitesi U/gram yaş doku olarak verildi.

3.8.3.Kitotriozidaz enzim aktivitesi ölçüm yöntemi:

Bağırsak doku homojenatında, sodyum Asetat tampon ve 4-Metilumbelliferilkitotriozid içeren substratla 37°C de yaklaşık 3 saat inkübe edildikten sonra üzerine etilendiamin çözeltisi eklenmesiyle oluşan fluoresans, fluorometrik olarak eksitasyon: 360 nm, emisyon: 445 nm olacak şekilde okundu. Sonuçlar mikromol/mgpr olarak verildi.

3.8.4.Bağırsak Dokusundaki İnflamatuvar Sitokin ve Mediatörlerin Değerlendirilmesi

Bağırsak dokusunda, ELISA yöntemi ile poly(ADP-riboz) polimeraz (PARP), TLR4 , IL-6 bakıldı. PARP için PathScan Cleaved PARP (asp214) ELISA kit Cell, IL-6 için Assay Max Mouse IL-6 ELISA kit, TLR4 için ise TLR4 elisa kit UCSN Life Science kullanıldı. Sonuçlar IL-6 ng/gr doku, PARP absorbans/mg pr, TLR4 ng/mg pr olarak verildi.

İSTATİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel değerlendirme “Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 16.0 for Windows” programı kullanılarak gerçekleştirildi. PARP, kitotriozidaz, MPO, lökosit sayısı, absolü nötrofil sayısı, TBARS, IL-6, TLR4 sonuçları; ortanca (IR), ortalama \pm standart sapma ve minimum, maksimum olarak verildi. Gruplar normal dağılım göstermediği için non parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar için nonparametrik testlerden Mann Whitney ve Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p < 0,05$ olması istatistiksel anlamlılık olarak değerlendirildi.

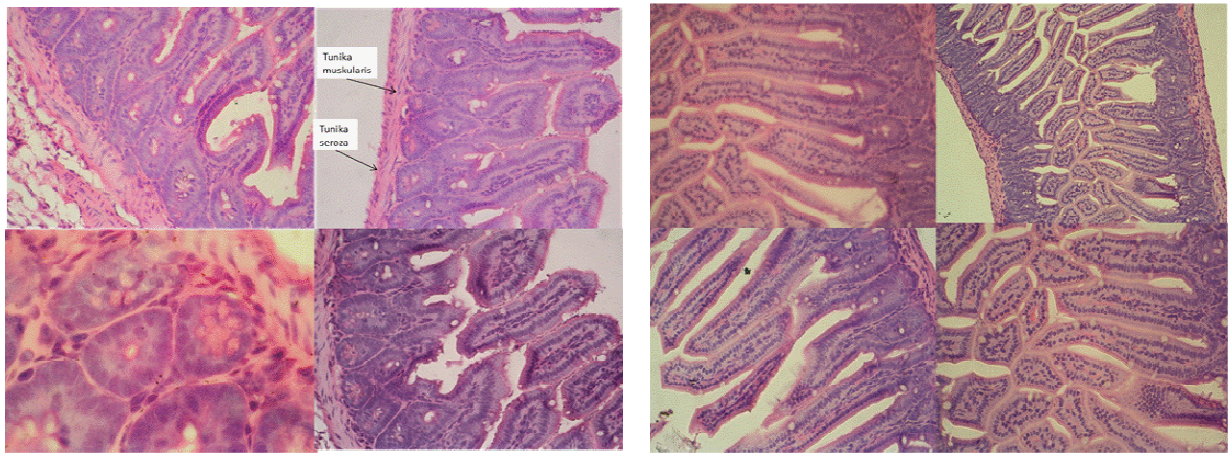
4.BULGULAR

4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

Tüm gruplar için beş ya da üç mikron kesitler alınarak hazırlanan preparatların doku bütünlüğü bozulup bozulmadığı mikroskopta kontrol edildi. Kesit düzleminde planlı parafine gömmeleri yapılan dokularda hem jejunum hem ileum bulunan transvers kesitler değerlendirildi. Seçilen parafinli kesitlerden her gruptan özel seçilmiş preparatlar Hematoksilen Eozin, PAS, Malory Azan ve Sudan Black ile histokimyasal ve TUNEL ile immunohistokimyasal olarak boyandı. Her preparatın gruplara göre bağımsız kontrollerini belirtecek şekilde 20, 40 ve 100 büyütmede mikrograf elde edildi.

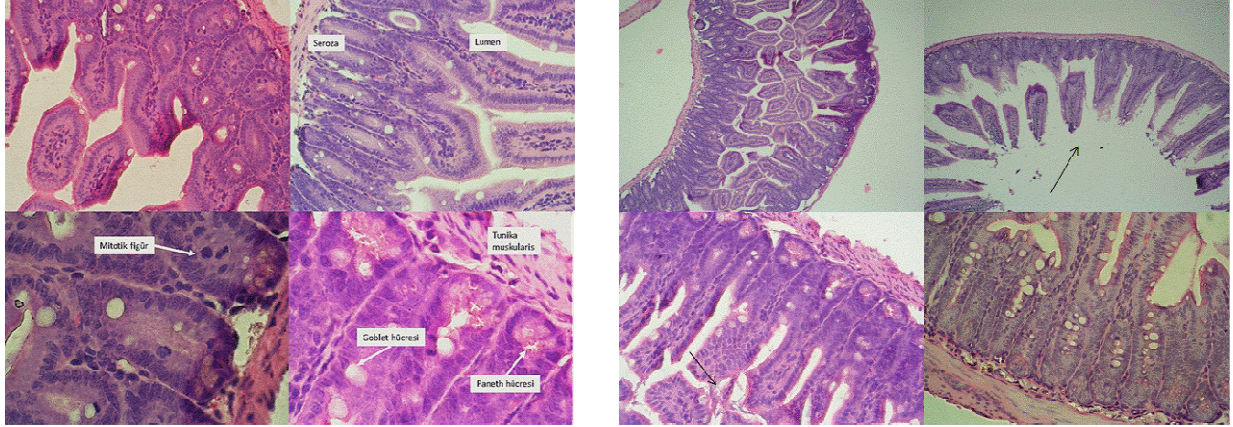
4.1.1. HEMATOKSİLEN EOSİN (HE) BOYALI PREPARATLARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

Kontrol grubunda (grup 1) HE ile boyanan preparatlarda, bağ ve epitel dokusundaki hücreler normal histolojik görünümde olarak saptandı. Jejunumda genişlemiş villusların yanısıra ileumda ince ve uzun villuslar görüldü. Epitel örtü hücreleri (mikrovilluslar, yüksek prizmatik hücreler), Goblet hücreleri, bez epitel dokusunun hücreleri normal sitolojik görünüme sahipti. Bezlerin ve bez epitelinin bazalinde bulunan Paneth hücrelerinin histogenezisin postnatal dönemde devam ettiği görüldü. Salgı granüllerinin aktif olduğu belirlendi. Sıralanmış örneklerde enterositlerin arasındaki mitotik aktivite bez epitelinin yan duvarlarında (Liberkühn kriplerinin olduğu alanda) saptandı. Goblet hücrelerinin dağılımı normal erişkin sıçan histolojik kesitlerindeki görüntülerden farklı değildi. (Resim 4).



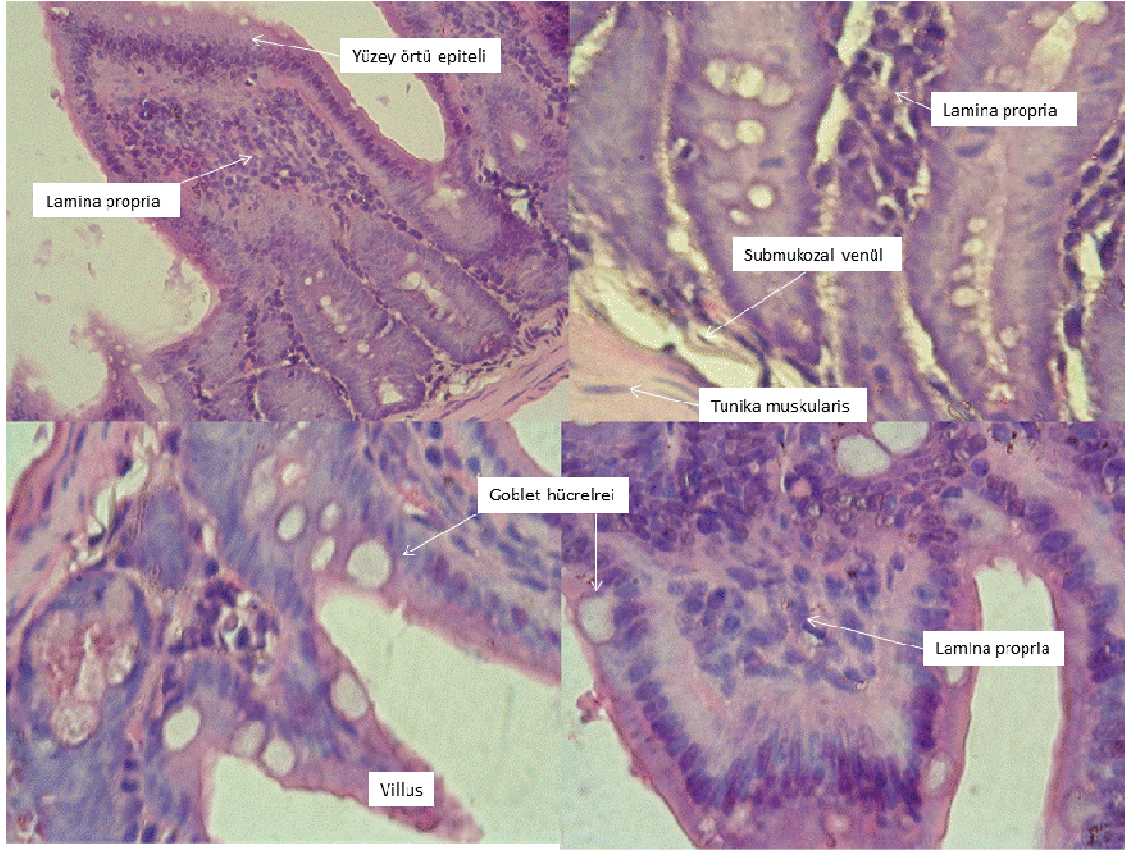
Resim 4: Grup 1 Bağırsakların Hematoksilen&Eosin ile boyanmış kesitleri (x40 ve x100)

Grup 2'de yüzey epitel ve bağ dokusu hücrelerinde mikrovilluslu yüksek prizmatik epitel hücreleri genellikle korunmuştu. Villusların apekslerinde yer yer hücresel kayıp ve submukozal ödem mevcuttu. Özellikle bez epitel dokusunda yüksek prizmatik epitel hücrelerinin arasında mitotik figürler dikkat çekmekteydi. Paneth hücrelerinin salgı granülleri ve hücrelerin kontürlerinde minimal değişiklikler saptandı. Goblet hücrelerinde artış ve kümeleşmeler görüldü. Yer yer submukoza ve bez epitelinin bazali çevrelerinde lenfatik genişlemeleri andıran açıklıklar saptandı.

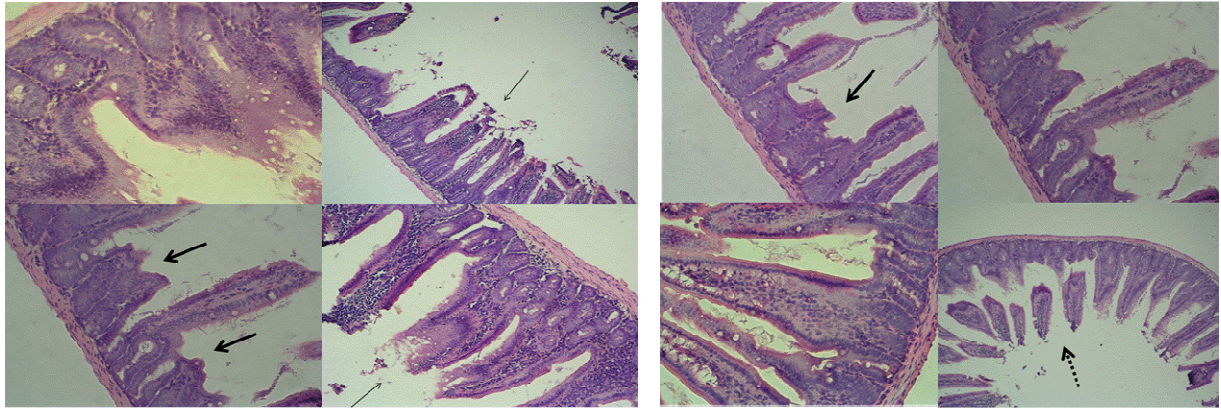


Resim 5: Grup 2 bağırsakların Hematoksilen & Eozin ile boyanmış kesitleri, oklar villuslarda ayrışmayı göstermektedir.

Grup 3'de villus ve lamina propria incelendiğinde; yüzey koruyucu örtü epitelinde yer yer yoğun kalınlaşmalar saptandı. Kesit kalınlığı ile senkronizasyon göstermeyen, çok sıralı epitel gibi duran yüzey örtü epiteli mevcuttu. Epitel hücrelerinde azalma, dökülme, ayrışmalar saptandı. Çoğunlukla ileumda künt veya incelmüş villuslar saptandı. Villusların lamina propriasında hücresel anlamda yoğunluk görüldü. Bu bölgede bulunan lamina propriada bağ dokusu hücrelerinde artış (+++) ve intersellüler ödem görüldü. Villuslarda goblet hücrelerinde azalma, bezlerde dilatasyon, panet hücrelerinde azalma salgı granüllerinin yokluğu veya sayılarındaki azalış belirgin olarak saptandı. Bazalde periglandular ödem buna bağımlı olarak Liberkühn bezlerinin dejenerasyonları ve salgı granüllerinin azalmasından kaynaklanan bez tabanında özellikle ileumda daralma saptandı.

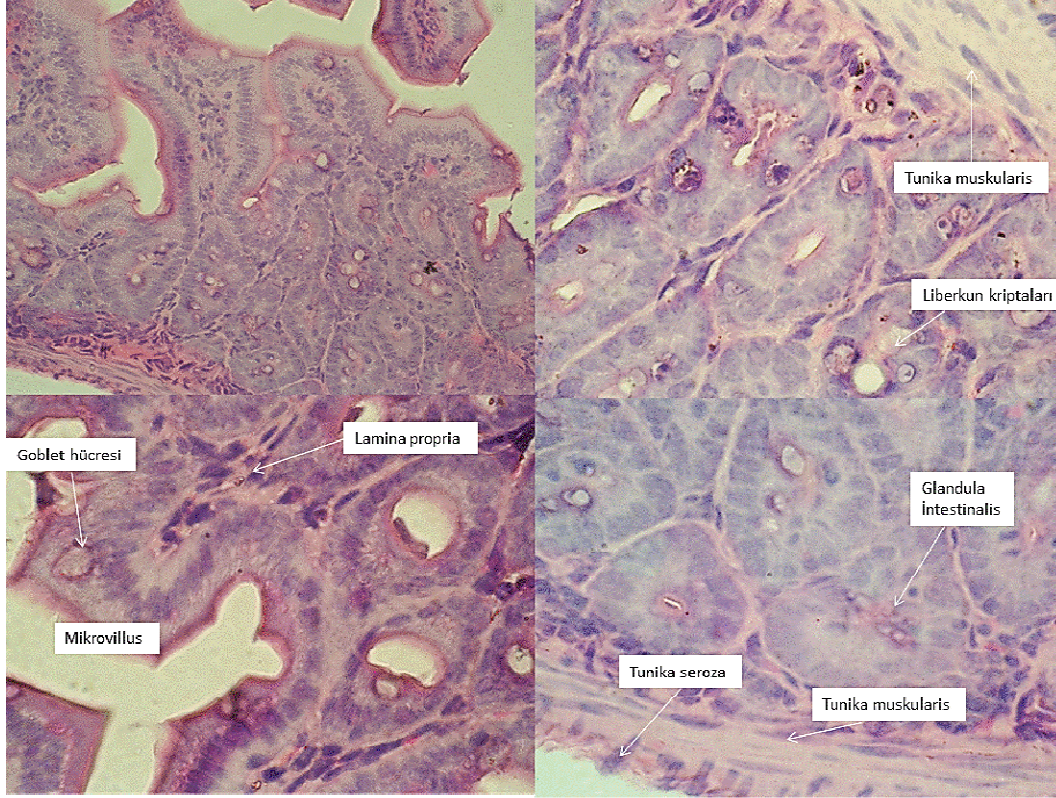


Resim 6: Grup 3 bağırsakların Hematoksilen & Eosin ile boyanmış kesitleri (x40, x100)

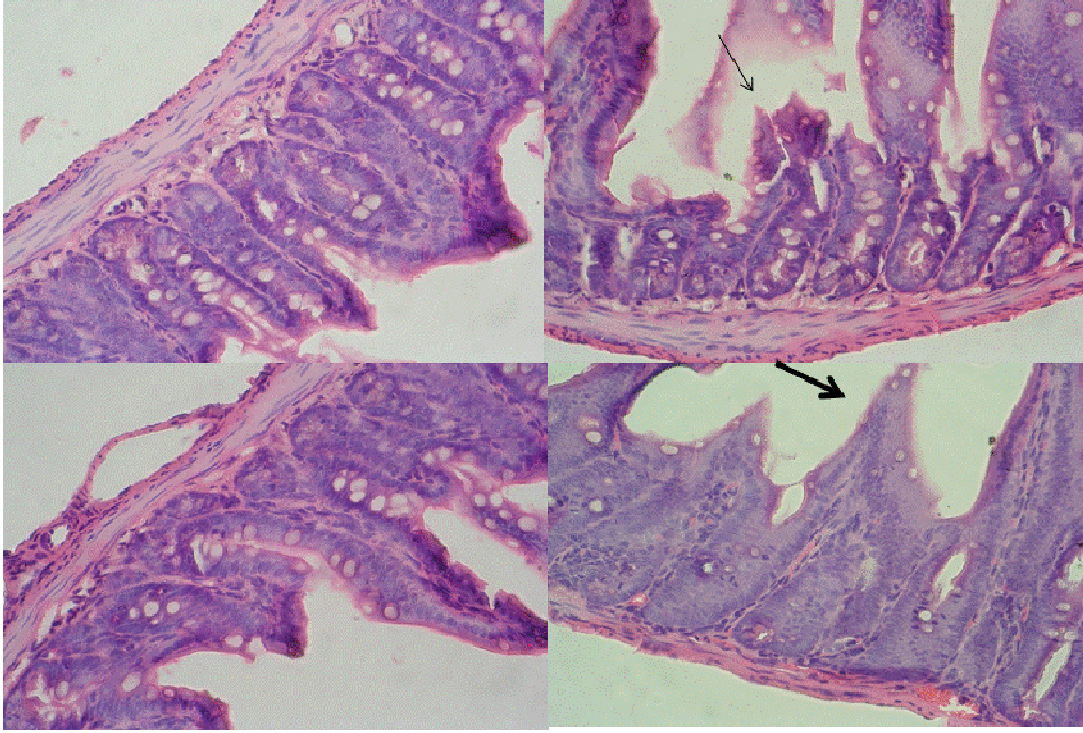


Resim 7: Grup 3 patolojik alanlar, ince ok subepitelyal ödem ve dökülme, kalın ok villus kaybı ve noktalı ok villuslarda ayrışmayı göstermektedir (Hematoksilen & Eozin, x40, x100)

Grup 4'de yer yer künt görülen villuslar olmasına karşın yüzey örtü epiteli incelendiğinde, mikrovilluslarda yer yer kayıplar saptandı. Bez epitel dokusunda dejeneratif değişiklikler mevcuttu. Bez epitel hücrelerinde Lamina propriada bağ dokusu hücrelerinde artış (+) mevcuttu. Submukozal ödem (+) saptandı. Goblet hücrelerinde yoğunlaşma, kümelenme veya dilatasyon görüldü. Paneth hücreleri bez etrafındaki ödeme bağlı olarak basık ve dejeneratif olarak saptandı.

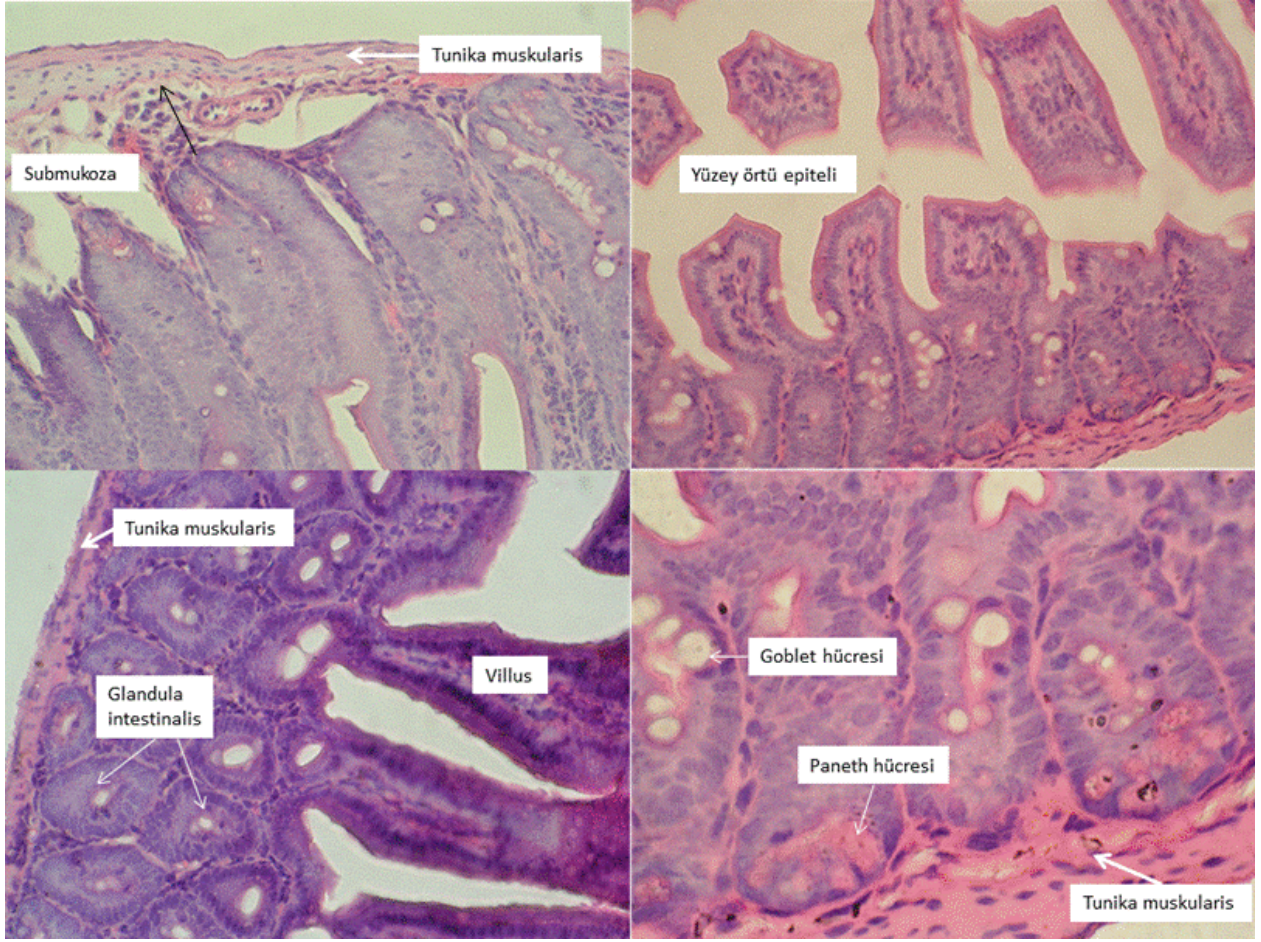


Resim 8: Grup 4 bağırsaklarda Hematoksilen & Eosin ile boyanmış kesitleri (x40, x100)

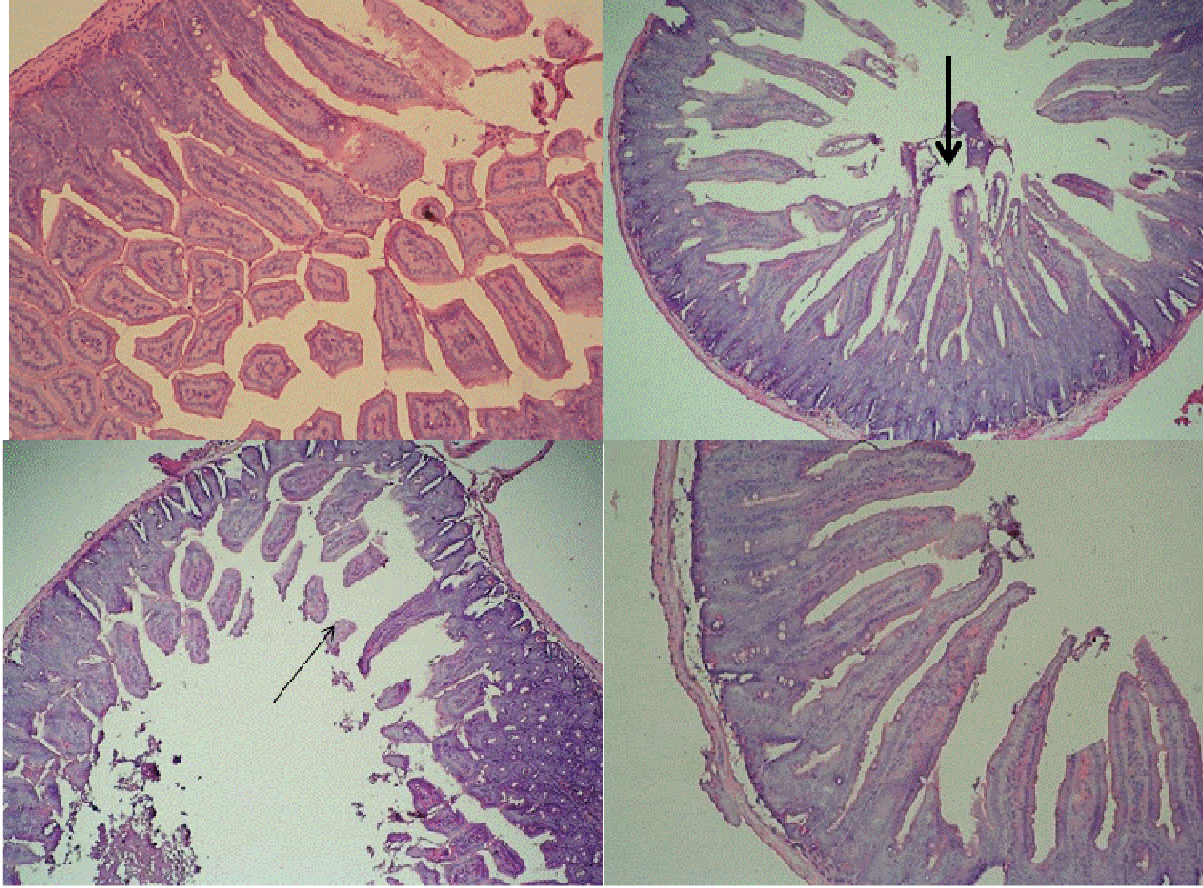


Resim 9: Grup 4 patolojik alanlar, ince ok villus kaybı, kalın ok villus küntleşmesini göstermektedir (Hematoksilen & Eozin, x40, x100)

Grup 5'de ileum ve jejunum incelenmiştir. Villuslarda yer yer epitelial dökülme ve ayrılmalar tanımlandı. Submukozal ödem (++) belirgindi. İleum villuslarında bağ dokusu hücrelerinde (++) artış saptandı. Glandula intestinalislerdeki Paneth hücrelerinin salgı granüllerinde dejenerasyon mevcuttu. Submukozal genişlemelere bağlı olarak Liberkün bezleri bazalde kesik koni imajı veren konfigürasyonlar ile tanımlandı.



Resim 10: Grup 5 bağırsakların Hematoksilen & Eosin ile boyanmış kesitleri, ince ok submukozal ödem göstermektedir (x40, x100)



Resim 11: Grup 5 bağırsakların Hematoksilen & Eozin ile boyanmış kesitleri, kalın ok subepitelyal ödem ve ayrışmayı, ince ok epitelyal ayrışmayı göstermektedir (x40, x100)

4.1.2. PAS BOYALI PREPARATLARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

PAS ile boyanan kontrol grubu preparatlarda tarandı (Resim 12).

Grup 1'de yüzeysel koruyucu epitelde düzgün mikrovilluslar, karakteristik hücreler ve aralarında izlenen goblet hücreleri düzgün dolu veya azalmış PAS pozitif reaksiyon veren bu hücrelerde doğal dağılım saptandı. Bez epitel dokusunda bulunan Goblet hücrelerinin yanısıra enterositler arasında daha az sayıda ve oldukça yoğun mitotik figürlere rastlandı.

Grup 2'de PAS (+) hücre sayısı bazı Goblet hücreleri ve Paneth hücreleri toplamı olarak belirlendi. Örtü epitelinde az oranda olmasına karşın özellikle bez epitel dokusunda çok sayıda mitotik figürler izlendi. Paneth hücrelerinin salgı granülleri goblet hücrelerine göre hafif derecede PAS + olarak saptandı.

Grup 3'de ileumda, daha hafif olarak PAS pozitif reaksiyon goblet hücreleri saptandı. Çok az sayıdaki Paneth hücreleri hafif PAS pozitif olarak boyandı. Yer yer

bezlerde intraepitelyal mitotik figürler ve PAS için metakromatik reaksiyon veren hücreler saptandı.

Grup 4'de PAS pozitif olan Goblet hücreleri özellikle bez epitelinin içeriğinde dilate veya kümeleşmiş hücre grupları olarak saptandı. Hafif PAS pozitif reaksiyon veren Paneth hücreleri ise bezlerin bazalinde yerleşmişti.

Grup 5'de PAS pozitif hücreler (Goblet) yüzey örtü epitelinde az sayıda olarak saptandı. Bez epitel dokusunda ise ayrıca bölgesel yığılmalar gösterdi. Paneth hücreleri ise dejenere-PAS pozitif hücreler olarak saptandı. Bazı villuslarda hem bez epitelini hem de yüzey örtü epitelini hücreleri sıkışık ve tek katlı imajını kaybetmiş çok sıralı epitel dokusu olarak saptandı.

4.1.3. BAĞ DOKUSU MALLORY AZAN BOYALI PREPARATLARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

Bağ dokusunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Kesit düzleminde geçişine göre liflerin submukozada ayrımları yapılmış olup, gelişimsel dönemlere göre submukozada kesit düzleminde geçen kollajenler; ödem, staz bulguları ile uyumlu olarak kümeleşme ve dağılımları saptandı. Özellikle Grup 5'de stazın dominant olduğu H/E bulguları ile uyumlu olarak liflerin ayrışması belirgindi. (Resim 13).

4.1.4. SUDAN BLACK BOYALI PREPARATLARDA BULGULAR

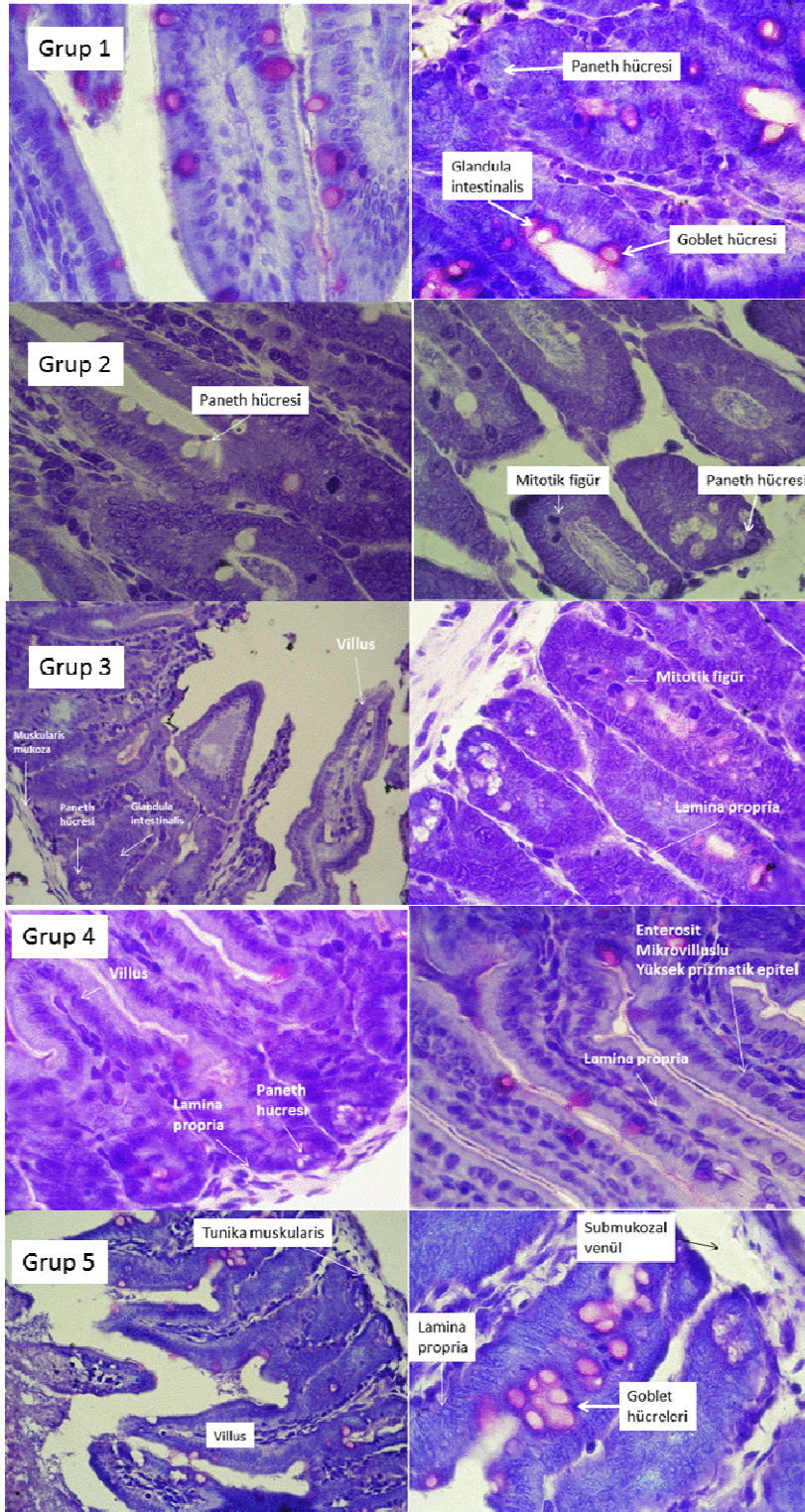
Lamina Propria da grup 1'e göre grup 3'de daha belirgin olmak üzere hücresel infiltrasyon (nötrofil) saptandı (Resim 14).

4.1.5. TUNEL İLE BOYANMIŞ PREPARATLARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

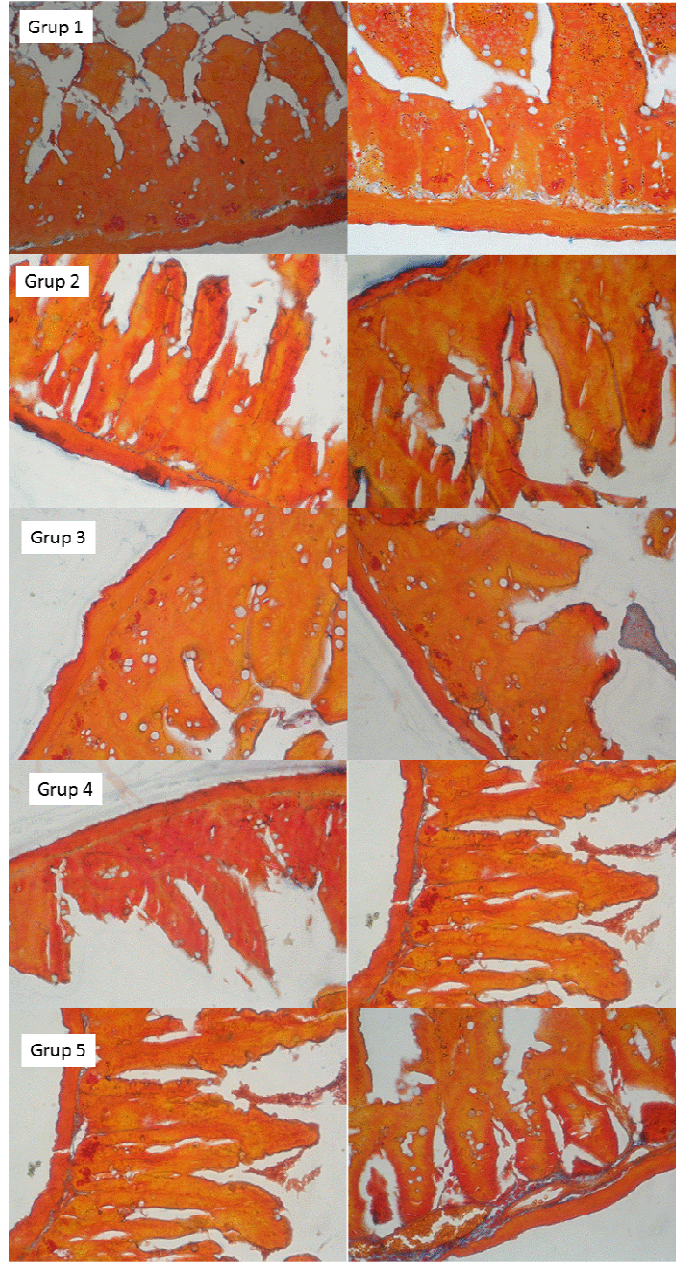
Grup 1'de yüzey ve bez epitel dokuları taranan preparatlarda her iki dokuyu oluşturan hücrelerde olağan gelişimsel yapı ile uyumlu apoptotik hücreler saptandı. Lamina propriada da histogenezis ile uyumlu olarak pozitif hücreler saptandı.

Diğer grupların incelenen immunareaktiflerinde genelde epitel dokularında farklılık saptandı. Grup 2'de Tunel (+) hücre, Grup 3'de ise Tunel (+++) hücre, Grup 4'de (+), Grup 5'de ise Tunel (++) hücre görüldü.

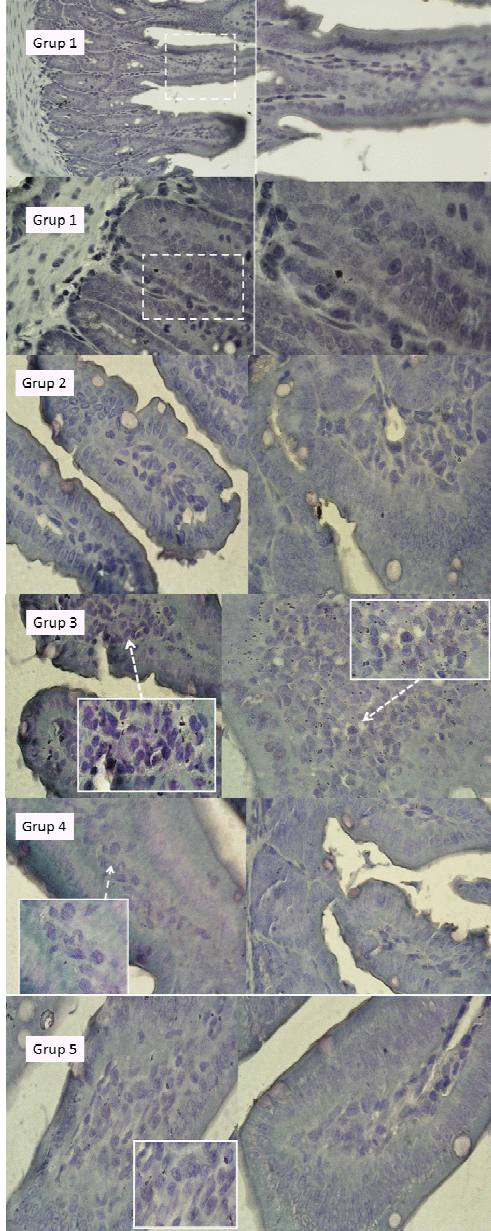
Grup 3 ve 5'te submukozal bağ dokusu hücrelerinde de genişlemiş venüller ile birlikte immün pozitif hücreler belirgindi.



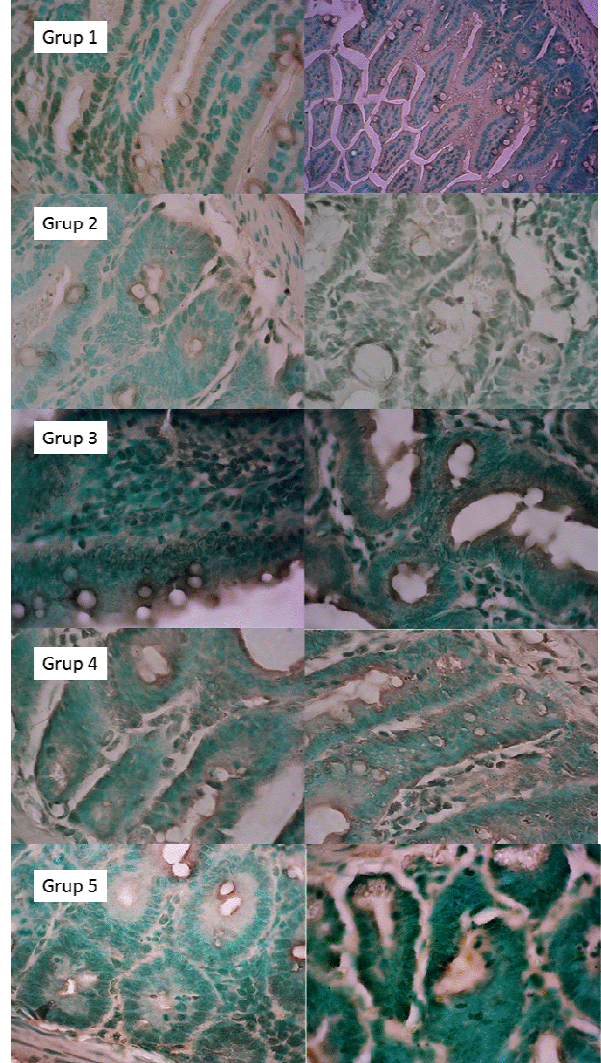
Resim 12: Gruplarda PAS boyanması



Resim 13: Gruplarda bağ dokusu boyanması



Resim 14: Sudan Black boyası ile nötrofillerin gösterilmesi, taralı alanların büyük büyütmeleri gösterilmiştir.



Resim 15: Gruplarda TUNEL ile boyanmış preparatlar

4.1.6. MİKROSKOBİK HASAR SKORLAMASI

Epitel ve lamina propria da hasar skoru en yüksek olarak Grup 3'te saptandı. Grupların hiçbirinde muskuler tabakada hasar saptanmadı.

Tablo 7: Epitel dokusunda mikroskopik hasar skorlaması

EPİTEL DOKUSU	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK
Ayrışma	Yok	++	++++	++	++
Dökülme	Yok	+	+++	+	+
Küntleşme	Yok	Yok	Var	Var	Var
Subepitelyel ayrışma (ödem)	Yok	++	+++	+	++
Mikrovillus	Normal	+	+++	++	++
Mitoz	Normal	++	+	N	N
Göblet	Normal	Artma	Azalma (kümelenme)	Hafif artma	Azalma (kümelenme)
Paneth/salgı granülleri	Normal	Dejenerasyon	Azalma ve dejenerasyon	Dejenerasyon	Dejenerasyon
Mikroskopik hasar skoru	0	9	16	8	10

Tablo 8: Lamina propriada mikroskobik hasar skorlaması

Lamina propria	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK
Subepitelyel ödem	Yok	+	++	+	++
Hücresele infiltrasyon (nötrofil infiltrasyonu)	Normal	++	+++	+	++
Apoptoz	Normal	+	+++	+	++
Mikroskopik hasar skoru	0	4	8	3	6

4.2. DEMOGRAFİK VERİLER VE SERUM PARAMETRELERİ

Yavru farelerin ağırlıkları arasında fark bulunmadı. ($P < 0,11$) (Tablo 9).

Tablo 9: Gruplar arası yavru farelerin ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirilmesi

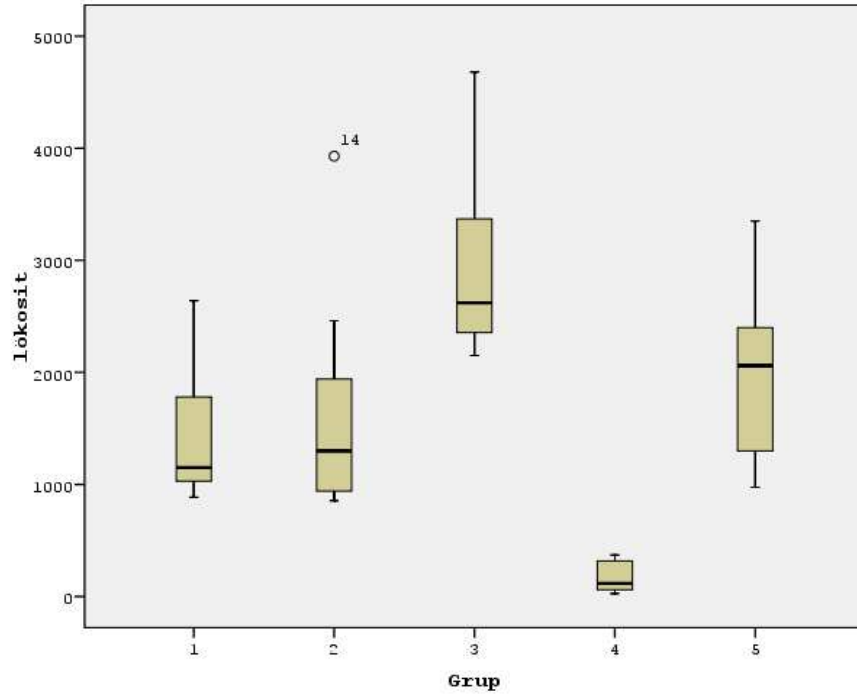
Ağırlık (gram)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	8,90	9,1	10,6	8,60	12,4	0,11
IR	2,50	3,75	5,65	3,90	3,4	
Minimum	7,6-14,1	6-12,5	5-14,2	5,8-10,7	8,2-14,1	
Maksimum						
Ortalama	9,55	8,78	10,32	8,32	11,94	
Standart deviasyon	2,21	2,34	3,33	1,95	2,09	

Lökosit sayıları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. ($p < 0,001$). Hipoksi-reoksijenizasyona uğratılmış ve yüksek doz G-CSF verilmiş grupta (Grup 3) yavru farelerde lökosit sayıları anlamlı artış ($p < 0,009$) gösterirken nötropenik grupta (Grup 4) anlamlı azalma ($p < 0,001$) saptandı. (Tablo 10, Şekil 10). Lökosit sayıları açısından diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 10: Gruplar arası yavru farelerin lökosit sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi

Lökosit /mm ³	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	1150	1300	2620*	116*	2060	0,001
IR	1060	1531	1380	321	1470	
Minimum Maksimum	885-2640	855-3930	2150-4680	26-371	974-3350	
Ortalama	1470,71	1692,29	2985,71	181,14	1969,14	
Standart deviasyon	656,39	1129,63	1380	150,166	847,53	

* $p < 0.05$ kontrol grubundan anlamlı farklı



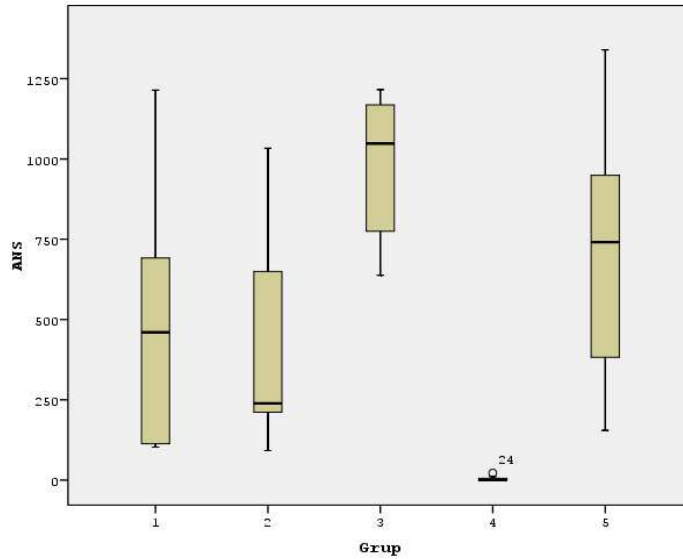
Şekil 10: Lökosit sayılarının gruplara göre dağılımı

Absolü nötrofil sayıları açısından gruplar arası anlamlı fark bulundu. ($p < 0,001$). Kontrol grubuna göre (Grup 1) yüksek doz G-CSF (Grup 3) grubunda anlamlı artış ($p < 0,04$) saptanırken, nötropenik (Grup 4) grupta anlamlı azalma ($p < 0,001$) saptandı. (Tablo 11, Şekil 11).

Tablo 11: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu absolü nötrofil sayılarının (ANS) istatistiksel değerlendirilmesi

ANS	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	460	239	1048*	0,00*	741	0,001
IR	779	748	483	11	860	
Minimum Maksimum	103-1214	92-1033	638-1216	0-22	155-1340	
Ortalama	483,71	440,86	969,8	4,71	699,86	
Standart deviasyon	430,66	382,57	240,4	8,65	435,90	

* $p < 0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı



Şekil 11: Gruplara göre absolü nötrofil sayılarının değişimi (ANS: Absolü nötrofil sayısı)

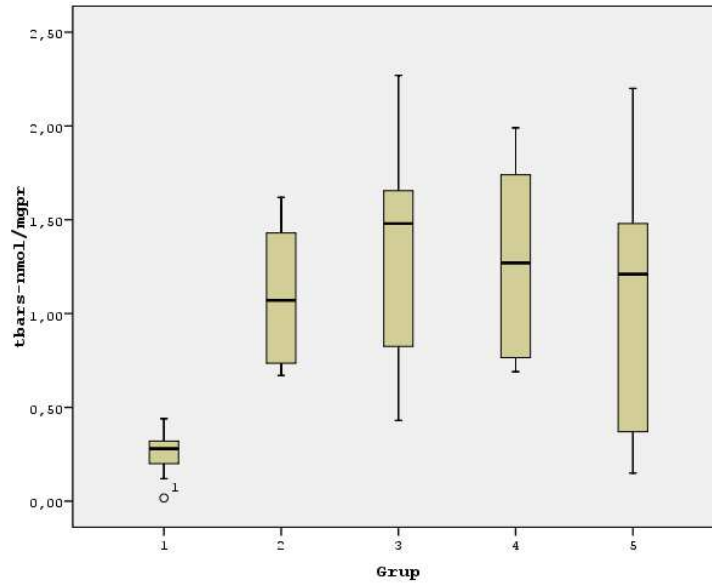
TBARS değerleri açısından gruplar arası anlamlı fark bulundu. ($p < 0,007$). TBARS düzeyleri kontrol (Grup 1) grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı olarak artış saptandı ve en yüksek düzeye yüksek doz G-CSF (Grup 3) grubunda ulaşıldı. (Tablo 12, Şekil 12).

Tablo 12: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu TBARS düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

TBARS (nmol/mgpr)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Ntrogenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	0,28	1,07*	1,48*	1,27*	1,21*	0,007
IR	0,23	0,81	1,17	1,18	1,32	
Minimum Maksimum	0,20-0,44	0,67-1,62	0,43-2,27	0,69-1,99	0,15-2,20	
Ortalama	0,25	1,09	1,30	1,28	1,03	
Standart deviasyon	0,14	0,39	0,65	0,55	0,76	

* $p < 0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı

Grup 1 ve Grup 2 arası $p < 0,002$, Grup 1 ve Grup 3 arası $p < 0,003$, Grup 1 ve Grup 4 arası $p < 0,002$, Grup 1 ve Grup 5 arası $p < 0,047$



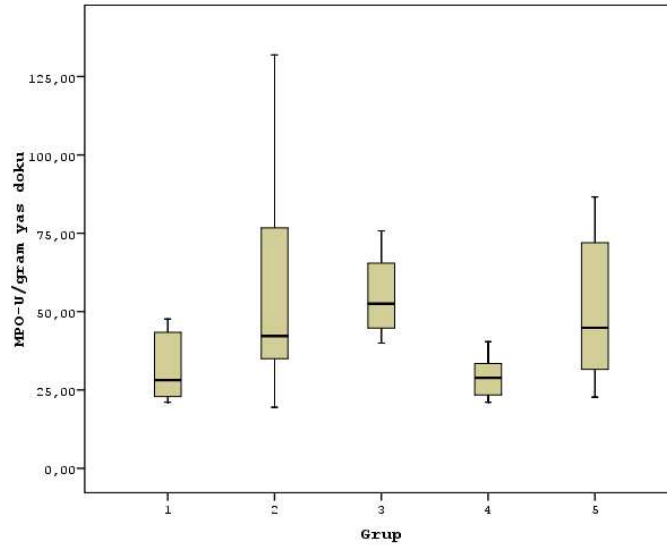
Şekil 12: Gruplara göre TBARS düzeyleri dağılımı

MPO aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,04$). Kontrol (Grup 1) grubuna göre yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) grupta MPO aktivitesi anlamlı yüksek bulundu ($p<0,021$). Ayrıca nötropenik grup (Grup 4) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark saptandı. ($p<0,003$) (Tablo 13, Şekil 13).

Tablo 13: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu MPO aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

MPO (U/gr doku)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	28,13	42,20	52,53*	28,86	44,84	0,04
IR	23,84	57,01	32,36	9,74	50,95	
Minimum	21,10-	19,48-	39,96-	23,38-	22,73-	
Maksimum	47,62	131,88	75,76	40,40	86,58	
Ortalama	32,77	59,56	55,51	30,21	51,60	
Standart deviasyon	11,62	39,31	14,49	6,04	25,63	

* $p<0.05$ kontrol grubundan anlamlı farklı



Şekil 13: MPO aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Kitotriozidaz aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. ($p < 0,02$). Kontrol (Grup 1) grubu ile düşük doz G-CSF grubu (Grup 2) arasında anlamlı fark saptandı. ($p < 0,02$). Kontrol (Grup 1) grubu ile yüksek doz G-CSF grubu (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,003$). Grup 3 en fazla kitotriozidaz aktivitesinin yükseldiği gruptu (Tablo 14, Şekil 14).

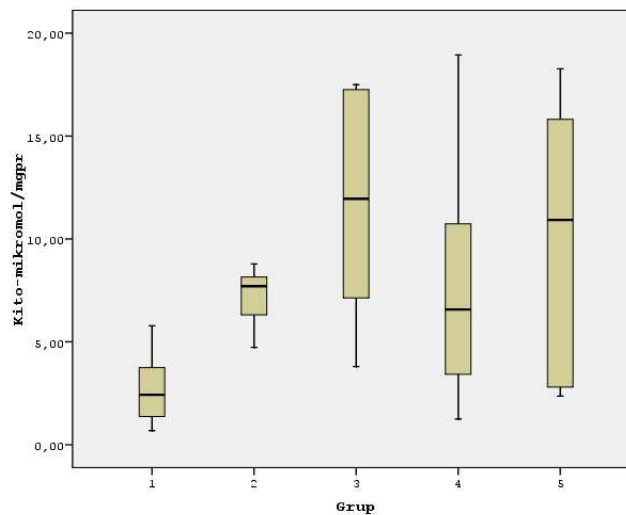
Tablo 14: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu kitotriozidaz aktivitelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Kitotriozidaz (Mikromol/mgpr)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	2,42	7,70*	11,95*	6,57	10,92	0,02
IR	2,39	2,39	11,68	10,13	13,20	
Minimum Maksimum	0,68-5,78	4,74-8,78	3,80-17,50	1,25-18,94	2,36-18,27	
Ortalama	2,73	7,16	11,72	7,87	9,82	
Standart deviasyon	1,79	1,44	5,81	6,21	7,05	

* $p < 0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı

Grup 1 ve Grup 2 $p < 0,02$, Grup 1 ve Grup 3 $p < 0,003$, Grup 1 ve Grup 4 $p < 0,08$

Grup 1 ve Grup 5 $p < 0,06$



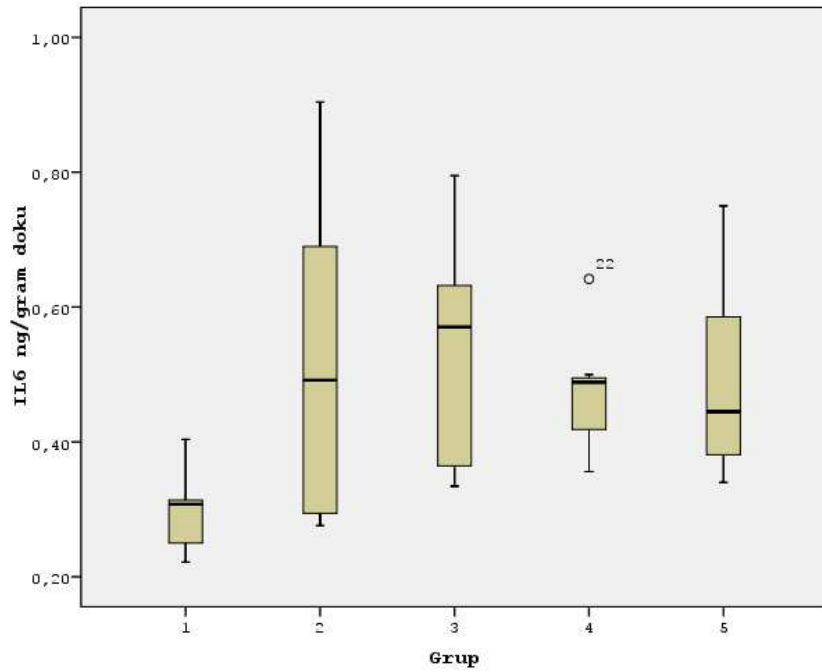
Şekil 14: Kitotriozidaz aktivitesinin gruplara göre dağılımı

IL-6 düzeyleri; gruplar arasında anlamlı farklı bulundu. ($p < 0,02$). Kontrol grubu (Grup 1) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu. ($p < 0,006$). Grup 3 IL-6 düzeyinin en fazla yükseldiği gruptur. Kontrol grubu (Grup 1) ile nötropenik grup (Grup 4) arasında anlamlı fark bulundu. ($p < 0,003$). Kontrol grubu (Grup 1) ile tedavisiz NEK (Grup 5) arasında anlamlı fark saptandı. ($p < 0,006$) (Tablo 15, Şekil 15).

Tablo 15: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu IL-6 düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

IL-6 (ng/gr doku)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	0,30	0,49	0,57*	0,48*	0,44*	0,02
IR	0,07	0,50	0,31	0,09	0,30	
Minimum Maksimum	0,22-0,40	0,28-0,90	0,33-0,79	0,36-0,64	0,34-0,75	
Ortalama	0,29	0,51	0,52	0,47	0,49	
Standart deviasyon	0,06	0,25	0,17	0,09	0,15	

* $p < 0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı



Şekil 15: IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

TLR4 düzeyleri; gruplar arasında anlamlı farklı bulundu ($p < 0,03$). Kontrol grubu (Grup 1) ile düşük doz G-CSF grubu (Grup 2) arasında anlamlı fark mevcuttu ($p < 0,03$). Kontrol grubu (Grup 1) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu. ($p < 0,02$). Grup 3 TLR4 düzeyinin en fazla yükseldiği gruptu. (Tablo 16, Şekil 16).

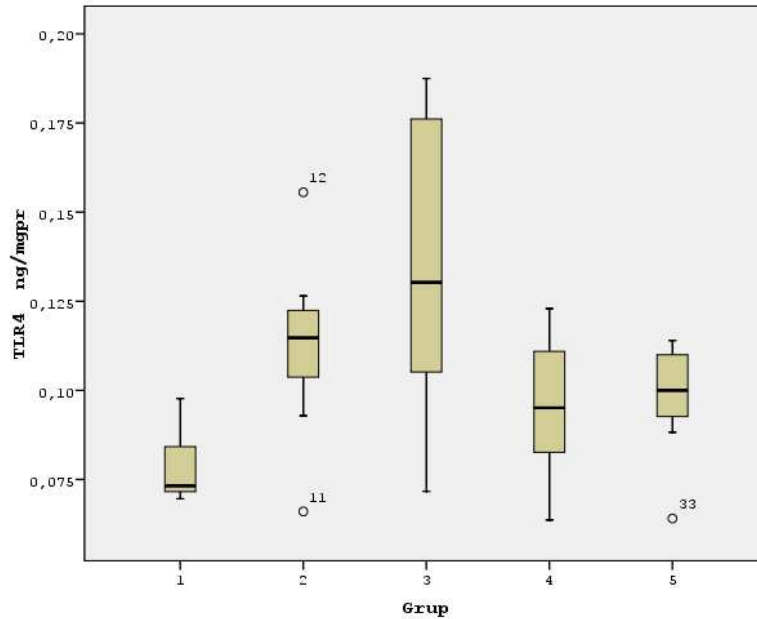
Tablo 16: Gruplar arası yavru farelerde bağırsak dokusu TLR4 düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

TLR4 (ng/mg protein)	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	0,07	0,11*	0,13*	0,09	0,10	0,03
IR	0,02	0,03	0,09	0,04	0,02	
Minimum Maksimum	0,07-0,10	0,07-0,16	0,07-0,19	0,06-0,12	0,06-0,11	
Ortalama	0,07	0,11	0,13	0,09	0,09	
Standart deviasyon	0,01	0,02	0,04	0,02	0,01	

* $p < 0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı

Grup 1 ve Grup 2 $p < 0,03$, Grup 1 ve Grup 3 $p < 0,02$, Grup 1 ve Grup 4 $p < 0,11$

Grup 1 ve Grup 5 $p < 0,06$



Şekil 16: TLR4 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

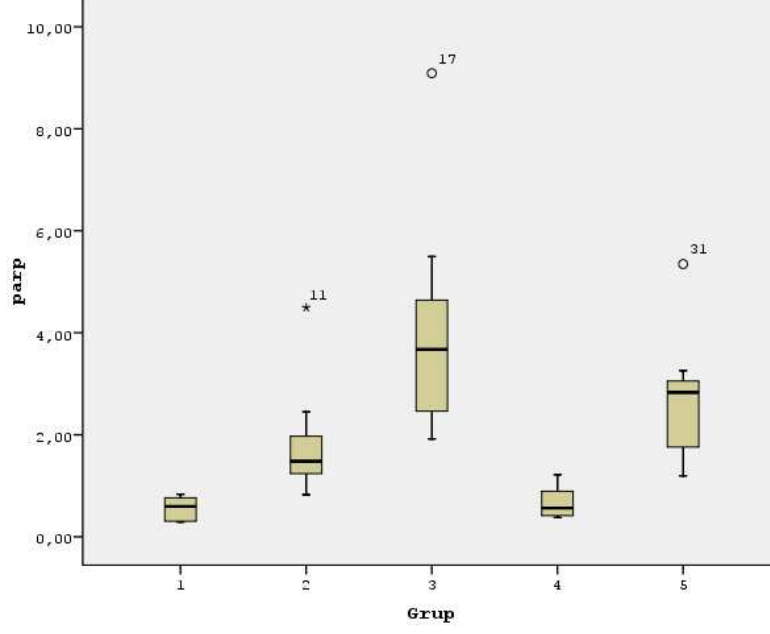
PARP düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklı bulundu ($p=0,001$). Nötropeni yapılan (Grup 4) grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p<0,62$). Düşük doz G-CSF (Grup 2) ve yüksek doz G-CSF (Grup 3) uygulanan gruplarla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). Sadece H/R uygulanan (Grup 5) grupla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). Grup 5 ile yüksek doz G-CSF (Grup 3) uygulanan fareler arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p<0,20$). Ancak H/R uygulanan tüm gruplar arasında en yüksek düzeye grup 3 ulaştı. Grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,004$) (Tablo 17, Şekil 17).

Gruplar arasındaki genel değerlendirme Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 17: Hipoksi-rekoksijenizasyona uğratılmış yavru farelerde bağırsak dokusu PARP düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

PARP absorbans/mg protein	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Ortanca	0,59	1,48*	3,67*	0,56	2,83*	
IR	0,48	1,34	3,05	0,80	1,66	
Minimum Maksimum	0,29-0,83	0,83-4,50	1,92-9,09	0,38-1,22	1,19-5,35	0,001
Ortalama	0,55	1,88	4,12	0,68	2,76	
Standart deviasyon	0,24	1,25	2,49	0,37	1,38	

* $p<0,05$ kontrol grubundan anlamlı farklı



Şekil 17: PARP sonuçlarının gruplara göre dağılımı

Tablo 18: Gruplar arasındaki değerlendirme

Ortanca	Grup 1 Kontrol	Grup 2 Düşük doz G-CSF	Grup 3 Yüksek doz G-CSF	Grup 4 Nötropenik	Grup 5 Tedavisiz NEK	p değeri
Lökosit sayısı	1150	1300	2620*	116*	2060	0,001
Absolü nötrofil sayısı	460	239	1048*	0,00*	741	0,001
TBARS	0,28	1,07*	1,48*	1,27*	1,21*	0,007
MPO	28,13	42,20	52,53*	28,86	44,84	0,04
Kitotriozidaz	2,42	7,70*	11,95*	6,57	10,92	0,02
IL-6	0,30	0,49	0,57*	0,48*	0,44*	0,02
TLR4	0,07	0,11*	0,13*	0,09	0,10	0,03
PARP	0,59	1,48*	3,67*	0,56	2,83*	0,001

*P<0.05 kontrol grubundan anlamlı farklı

5.TARTIŞMA

NEK, özellikle prematür yenidoğanları etkileyen, bu dönemdeki morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. NEK geliştiği zaman morbidite ve mortalitenin yüksek olması, hastane masraflarının artması, uzun dönemdeki komplikasyonlarının ciddi olması NEK patogenezinin anlaşılması için gerekli çalışmaların ne kadar önemli olduğunu açıklar. Ancak yapılan birçok çalışmaya rağmen NEK' in kesin patofizyolojisi henüz anlaşılammıştır.

Nekrotizan enterokolit multifaktörial bir hastalıktır. Nekrotizan enterokolit gelişimine en önemli katkıyı yapan risk faktörü prematüredir. Prematürüde ortaya çıkan gastrointestinal sistem immatüritesi NEK gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Prematüre bebekte, immatür bağırsak motilitesi epitel ile teması olan zararlı maddelerin birikmesine, bağırsak hasarı oluşmasına neden olmakta bakterilerin kolonizasyon ve translokasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bağırsak kanlanması NEK gelişimine katkıda bulunan bir diğer faktördür. Vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon arasındaki dengesizlik iskemik hasar gelişimine katkıda bulunmaktadır (252-254).

Patogeneizde en önemli olaylardan birisi hipoksik-iskemik gastrointestinal hasardır. İnce bağırsakta ortaya çıkan iskemi-reperfüzyon hasarı reaktif oksijen ürünlerinin lokal üretimini oluşturmakta ve mukozal bütünlüğün bozulmasına neden olmaktadır. Aktive nötrofiller, bağırsak epitel enzimleri reaktif oksijen ürünleri oluşturur ve bu ürünler doku hasarını ortaya çıkarır. Endojen reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasında ksantin oksidaz enzimi önemli rol oynamaktadır. Aktive nötrofillerden salınan inflamatuvar mediatörler vazokonstriksiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, reaktif oksijen ürünleri salınımı ve prematüre bebeklerde bağırsak bariyer işlevinin bozulmasına neden olur (255-258). Hipoksi ve reperfüzyon ile ilişkili bağırsak hasarında apoptozun gelişim basamakları tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda bağırsak sisteminde programlanmış hücre ölümünün serbest oksijen radikalleri ve aktive lökositlerle başladığı, antioksidan maddeler ve lökositlerin aktivitesini önleyen sitokinlerin verilmesi ile apoptozun belirgin oranda azaldığı gösterilmiştir (234-239).

Bağırsak iskemisi ve hipoksinin etkileri birçok hayvan modelinde çalışılmıştır. Yenidoğan köpek yavrularında hipoksinin ışık mikroskobu ve ultrastrüktürel analiz ile mukozal hasar yaptığı gösterilmiştir (259-260). Yenidoğan domuz yavrularında hipoksi mukozal kan akımında azalma ve mukozal iskemik değişiklikler oluşturmuştur. NEK patogeneğinde bağırsak iskemisi, hipoksi ve bakterial kolonizasyon inflamatuvar sürecin başlamasında ve sitokinler tarafından oluşturulan doku hasarında rol almaktadır (261). Gastrointestinal sistem motilitesi üzerine hipoksinin olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir. Hayvanlarda hipoksi oluşturarak yapılan bazı deneysel çalışmalarda da hipoksinin intestinal intrinsik ritmi ve mide boşalmasını geciktirdiği, spontan ince bağırsak ve mide kontraksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (262). Hipoksinin neden olduğu gastrointestinal sistem kontraksiyon azalması indirekt olarak da bakteri translokasyonu riskini arttırmaktadır. Hipoksinin neden olduğu gastrointestinal sistem motilite azalması hayvan deneylerinin yanısıra izole insan bağırsağında da gösterilmiştir (263).

Hayvan çalışmalarında çeşitli hipoksi-reoksijenizasyon modelleri uygulanmıştır. Canpolat ve ark (264) sıçanlar üzerine yaptığı çalışmada H/R modeli uygulamışlardır. Hipoksi için deney hayvanlarını hava geçirmeyen bölme içine almışlar ve 5 dakika boyunca %100 karbondioksit uygulamışlardır. Hipoksi ardından, deney hayvanları 5 dakika süre ile %100 oksijen ile reoksijenize edilmişlerdir. Tüm hayvanlar 5. günde öldürülmüş ve bağırsak örneklerinde histolojik değerlendirme yapılmıştır. Tedavi edilmeyen sıçanlardaki histolojik bulgular, muskularis tabakasına kadar villusların ve kriptlerin destrüksiyonu, neonatal NEK'te görülene benzer bulunmuştur.

Kumral ve ark (265) çalışmalarında yaşamın 15. gününde, hipoksi sıçan yavruları %100 karbondioksit içeren odaya 5 dakika yerleştirilerek uygulanmıştır. Hipoksiden sonra, sıçan yavruları 10 dakika %100 oksijen ile reoksijenize edilerek annelerinin yanına geri verilmiştir. Hipoksi-reoksijenizasyondan 4 saat sonra yavrular öldürülmüştür. Tedavi uygulanmayan NEK grubunda full mukozal hasar ve Tunel pozitif hücre sayısı kontrole göre anlamlı yüksek saptanmıştır. Cadir ve ark (266) vitamin E ve omeprazolun oksijen radikalleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmasında, 4-6 gr sıçan yavrularında H/R modeli, 15 dk %100 CO₂ ve sonrasında 15 dakika %100 O₂ 5 gün süre ile uygulanarak oluşturulmuştur. Hipoksi ve reoksijenizasyon yapılanların hepsinde bağırsak hasarı saptanmıştır. Balyemez ve ark (267) çalışmasında H/R modeli 1 günlük Wistar albino sıçanlarda hava geçirmez oda içine

konularak %95 azot gazı (N₂) ve %5 CO₂ 10 dakika süre ile solutulmuştur. Daha sonra hayvanlar 10 dk %100 oksijen ile solutulup annelerin yanlarına gönderilmiştir. Beş gün süre ile H/R uygulanmıştır. Mikroskopik lezyon olarak H/R alan sıçanlarda; villus ve kriptlerde ağır destrüksiyon saptanmıştır. Özdemir ve ark (268) Wistar albino cinsi 1-4 (6 gr) günlük ratlarda bizim çalışmamızdaki modeli uygulamışlardır. Ancak hayvanlar 6. saatte sakrifiye edilmişlerdir. Makroskopik bulgu olarak bağırsaklarda renk değişikliği, distansiyon ve hemorajik odaklar saptanmıştır. Median histolojik hasar skoru (HIS) H/R grubunda 3.0 (3-3), kontrol grubunda ise 1.0 (1-1) olarak saptanmıştır. NEK grubunda villusların tepesinde epitelyal nekroz gösterilmiştir. Cintra ve ark (269) 4.5-6.5 gr ağırlığındaki sıçan yavrularında günde 2 kez gaz odası ile önce %100 CO₂ hipotermi (4°C) ve ardından 5 dk ısıtma ve %100 oksijen 5 dk süre ile uygulanmıştır. Bu uygulama 3 gün süre ile yapılmıştır. H/R uygulanalarda HIS skoru: ortalama 3.8 (3-5) olarak saptanmıştır. Villöz ayrılma, hasar, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler dilatasyon, nekrotik materyel varlığı, submukoza kaybı saptanmıştır. Tayman ve ark (270) çalışmasında Sprague-Dawley gebe sıçanlar tarafından doğrulan yavrular çalışmaya alınmıştır. Hipoksi-reoksijenasyon modeli olarak, %100 CO₂ ile 10 dk inhalasyon ve arkasından soğuk uygulama (5 dk) ve 5 dk süre ile %97 O₂ uygulanmıştır. NEK grubunda; parsiyel ve total villus kaybı, submukozaya kadar uzanan nekroz ve apoptotik hücre sayısında artış saptanmıştır. Seitz ve ark (271) çalışmasında, Sprague-Dawley neonatal sıçanlarda H/R modeli uygulanmıştır. Formula ile beslenme, asfiksi (%100 N₂ 60 saniye), soğuk uygulama (+4°C) ile NEK modeli oluşturulmuştur. Bu uygulama günde 2 kez yapılmış ve 96 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir. NEK oluşturulan grupta makroskopik olarak bağırsaklarda hemoraji, distansiyon, perforasyon saptanmıştır. NEK grubunda grade 3 ve 4 (3.28-0.32) derece ağır hasar saptanmıştır. Bu uygulanan model ile diğer hayvan çalışmalarında saptanan NEK bulgularına benzer bulgular elde edilmiştir. Ceylan ve ark (272) çalışmasında 1 günlük Wistar albino cinsi sıçan yavrularında H/R modeli olarak, %95 N₂ + %5 CO₂ 10 dk ardından %100 oksijen 10 dk uygulanmıştır. Diğer bazı çalışmalarda H/R modelinde %100 CO₂ kullanılmıştır. Ancak %100 CO₂'nin hipotermi etkisi iyi bilindiğinden bu çalışmada CO₂'nin hipotermik etkisini önlemek için N₂ ve CO₂ karışımı uygulanmıştır. H/R uygulanan grupta histopatolojik grade 3.25 ± 0.46; kontrol grubunda ise grade 0.13 ± 0.35 olarak saptanmıştır. Mikroskopik olarak, villuslarda belirgin kısalma ve füzyon ayrıca kriptlerde kayıplar saptanmıştır. Bizim çalışmamızda daha önce Akisu ve ark

(75) tarafından uygulanan ve neonatal NEK bulguları gösterilen H/R modeli uygulandı. Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni, kolay uygulanabilir olması ve bu model üzerinde tecrübemiz olmasıdır. H/R uygulanan gruplarda; villuslarda subepitelyel ödem, epitel hücrelerinde dökülme, ayrışma, villuslarda kayıplar saptandı. Goblet hücrelerinde dejenerasyon görüldü. Ancak muskuler tabakada hasar saptanmadı. Kontrol grubuna göre apoptotik hücrelerde artış saptandı. Diğer çalışmalardan farklı olarak PAS, Mallory Azan, Sudan Black boyalarıyla yapılarak hasar detaylandırılmıştır. Villuslar, goblet hücreleri, mitotik aktivite, Paneth hücreleri, lamina propria, submukozadaki patolojik bulgular toplanarak hasar skoru elde edilmiştir.

NEK olgularından elde edilen bağırsak materyallerinde gösterilen major histolojik özellik inflamasyon ve nötrofil infiltrasyonudur. Bağırsak materyallerinin %78'inde akut inflamasyon bulunmaktadır. Aktive PMN vasküler duvara yapışır ve reaktif oksijen radikalleri ve enzimler salarak vasküler hasara yol açarlar. İnflamatuvar yanıt doku hasarı ve bağırsakta bakteri çoğalmasına karşı uygun bir yanıtıdır, ancak ortaya çıkan mediatörler NEK'e zemin hazırlar. Aktive nötrofillerden salılan maddeler konak doku hasarına yol açar ve bağırsaktaki nötrofil infiltrasyonu NEK'te ortaya çıkan doku hasarını oluşturur (241-242).

Musemeche ve ark (242) çalışmasında deneysel nekrotizan enterokolitte PMN'lerin patogenezdaki rolü araştırılmıştır. Sıçanlarda NEK; PAF 1 mcg/kg ve bakterial endotoksin 1 mg/kg intravenöz kullanılarak oluşturulmuştur. Nötropeni modeli için ise 0.75 mg/kg vinblastin uygulanmıştır. Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır: (1) 1 mcg/kg PAF; (2) 1 mg/kg LPS; (3) 1 mcg /kg PAF + 1 mg/kg LPS; ve (4) nötropeni, 1 mcg /kg PAF + 1 mg/kg LPS. PAF ve LPS birlikte kullanımı uzamış hipotansiyon (kan basıncı 53.5 ± 13.8 mm Hg ikinci saatte), lökopeni (4.062 ± 497.4), hemokonsantrasyon (hematokrit $\%44.5 \pm \%1.1$), azalmış intestinal perfüzyon ($\%74 \pm \%13.3$) ve segmental barsak nekrozuna neden olmuştur. Ancak, Vinblastin uygulanan hayvanlarda PAF ve LPS hafif hipotansiyona (84.3 ± 9.2 mm Hg ikinci saatte) neden olmuştur, hemokonsantrasyon gelişmemiştir. Bu hayvanlarda bağırsak perfüzyonu normaldir ve barsak nekrozu görülmemiştir. Öztürk ve ark (273) çalışması, nötrofil-endotel hücre ilişkisinin iskemi-reperfüzyon hasarında bağırsak bariyer hasarının temelini oluşturduğunu desteklemektedir. Bu çalışmada da PNL sayısı iskemi ve reperfüzyon hasarı yapılan grupta yüksek olarak saptanmıştır.

Vasküler duvara lökosit infiltrasyonu iskemi-reperfüzyon hasarında erken ve hız sınırlayıcı basamak olarak belirlenmiştir. Canpolat ve ark (264) çalışmasında histolojik olarak submukozal mononükleer hücre infiltrasyonu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda nötrofillerin NEK patogenezindeki yerini belirlemek amacı ile nötropeni ve nötrofil oluşturulmuştur. Nötropeni modeli için siklofosfamid, nötrofil modeli için yüksek ve düşük doz G-CSF tedavileri kullanılmıştır.

Hayvan çalışmalarında nötropeni modeli için, 5-floraurasil, metotreksat ve siklofosfamid gibi immun supresif ilaçlar kullanılmaktadır. En sık kullanılan siklofosfamid (274). Günümüzde hayvan çalışmalarında 2 tip siklofosfamid-nötropeni modeli uygulanmaktadır. Yüksek doz nötropeni modelinde 350-450 mg/kg olarak intraperitoneal olarak uygulanır (274-276). Halen bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır ve fare lökositleri üzerindeki etkileri tanımlanmıştır. Günümüzde yaygın olarak düşük doz rejimi (250 mg/kg) tercih edilmektedir (277-278). Zuluaga ark (279) çalışmasında düşük doz siklofosfamid tedavisini 1. gün 150, 4. gün 100 mg/kg olarak uygulamışlardır. Dördüncü günde lökosit sayısı %84 azalmış ve belirgin nötropeni sağlanmıştır. 5. ve 6. günlerde nötropeni devam etmiştir. Diğer yöntem, göre daha basit, güvenli uygulandığı da bu çalışmada vurgulanmıştır. Cirioni ve ark (280) çalışmasında, 25-33 gr ağırlığındaki balb/c tipi farelerde, nötropeni modeli için, yüksek doz siklofosfamid kullanılmıştır. 200 mg/kg/gün intraperitoneal olarak 2. ve 4. günlerde olmak üzere 2 doz uygulanmıştır. Tansho ve ark (281) ise nötropeni modelini, infeksiyon öncesi 4. ve 1. günlerde verilen 150 mg/kg siklofosfamid ile oluşturulmuştur. Ruiz-Cendoya ve ark (282) çalışmasında ise nötropeni modeli tek doz intraperitoneal 200 mg/kg siklofosfamid ve tek doz intravenöz 150 mg/kg 5- fluorourasil uygulanması ile oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda daha güvenli olduğu için ve yan etkilerini azaltabilmek amacıyla düşük doz siklofosfamid modeli uygulanmıştır. Fare yavrularının hiçbirinde genel durumlarında patoloji saptanmamıştır ve ölen fare yavrusu olmamıştır. Farelerin son doz uygulamasından 24 saat sonra bakılan hemogram ve periferik yaymalarında belirgin lökopeni ve nötropeni saptanmıştır.

Granülosit koloni sitmüle edici faktör 18.8-kDa glikoproteindir. G-CSF spesifik reseptörü olan G-CSF-RS'e bağlanarak granülositik prekürsörlerin apoptozunu baskılar ve onların klonal çoğalmasını ve diferansiasyonunu destekleyerek nötrofil üretimini düzenler. G-CSF nötropenik ve nötropenik olmayan konakta fagositik ve

bakterisidal aktiviteleri uyarmaktadır. Literatürde infeksiyon modellerinde G-CSF subkutan olarak (5 mcgr/kg, 300 mcg/kg, 0.1mg/kg) çeşitli doz ve sayıda uygulanmıştır. G-CSF etkileri deneysel modellerde yararlı, zararlı ya da etkisiz bulunmuştur (283-285).

Çalışmamızda G-CSF NEK modeli oluşturmadan önce, 3 gün süre ile bir gruba 10 mcg/kg, diğer gruba 100 mcg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. NEK modeli oluşturulduğu dönemde lökosit ve nötrofil sayıları belirlendi. Kontrol grubuna göre ANS ve lökosit sayılarında yüksek doz uygulanan grupta anlamlı fark saptandı. Çalışmamızda yüksek doz G-CSF uygulanan grupta, Sudan Black boyasıyla yapılan preparatlarda bağırsak dokusunda diğer gruplara göre artmış hücre infiltrasyonu (nötrofil) saptandı. H/E incelemesinde ise; nötropeni grubunda hasar kontrol grubuna daha yakinken, Grup 5 ve Grup 3 daha belirgin olmak üzere artmış olarak saptandı. Ayrıca bunlara paralel olarak Tunel yöntemi ile bakılan apoptotik hücre sayısında Grup 3' de (+++) diğer gruplara göre artmış olarak saptandı.

İskemik zedelenme sonrası reperfüzyon ve reoksijenizasyon ile ortamda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O^-) ve hidroksil anyonu (OH^-) en önemli ve hasardan sorumlu serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve DNA hasarı oluşturarak hücre ölümüne (apoptozis) neden olurlar (119). Prematürlerde herhangi bir nedenle oluşan hipoksi-reoksijenizasyon sürecinde gelişebilecek olan bağırsak mukoza hasarlanmasından koruyucu olan antioksidan sistemler yetersizdir. Deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde bağırsak hasarı ve NEK gelişiminin azaldığı saptanmıştır. Doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile peroksidasyonu zincir tepkime şeklinde oluşur ve bu tepkime şiddetli olursa membran bütünlüğü bozulur. Aktif oksijen radikallerinin toksik etkisi sonucu özellikle MDA salınır ve hücre membranı yapısı içindeki doymamış yağ asitlerinin hasarına neden olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri toksisite derecesini gösterir. MDA testi yaygın olarak lipid peroksidasyonu ölçümünde kullanılmaktadır (286-288). MPO sadece PMN'lerde bulunan bir enzimdir (289). Doku ile ilişkili MPO aktivitesinin belirlenmesi reperfüzyon sonrası iskemik bağırsak dokusunun nötrofil infiltrasyonunu göstermektedir (290-291). Hipoksi ve reoksijenizasyon sonrası serbest oksijen radikalleri yoluyla oluşan lipid peroksidasyonu dokuda TBARS, nötrofil aktivitesi ise

dokuda MPO düzeylerinin ölçümü ile kantitatif olarak saptanabilir. Daha önceki çalışmalarda hipoksi ve reoksijenizasyon ile geliştirilen deneysel NEK modelinde barsak dokusunda TBARS ve MPO düzeylerinin kontrollere göre anlamlı oranda arttığı saptanmıştır.

Akisu ve ark (75) çalışmasında deneysel NEK modelinde rekombinant human eritropoetin (rhEPO)'nin serbest radikal reaksiyonu ile ilişkili lipid peroksidasyonu indeksi olarak bağırsak MDA ve PAF sentezi üzerine etkisi incelenmiştir. H/R uygulanan ve kontrol gruplarında barsakta MDA ve PAF düzeyleri belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre H/R uygulanan gruplarda ($p < 0.001$ ve $p < 0.001$) anlamlı artmış bağırsak MDA düzeyi bulunmuştur.

Akisu ve ark (169) L-arginin ve glutaminin NEK'te etkisini belirlemek için yaptığı çalışmada, 25-30 günlük balb-c farelerde (15-20 gr), çalışmamızla aynı H/R modeli uygulanmış, H/R grubunda TBARS düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olarak saptanmıştır. TBARS H/R grubunda 0.14 ± 0.08 (0.05-0.22) nmol/mg protein; H/R grubunda ise 0.06 ± 0.05 (0.03-0.06) olarak saptanmıştır.

Tayman ve ark yaptığı çalışmada (270), total oksidan durumu (Mmol H₂O₂ eşdeğeri/gprotein) kontrol grubunda 5.50 (1.86), H/R grubunda ise 54.34 (18.22), MPO (U/gprotein) düzeyleri ise kontrol grubunda 47.92 (8.63), H/R grubunda 167.90 (17.11) anlamlı yüksek olarak saptanmıştır. Seitz ve ark (271) çalışmasında, Sprague-Dawley neonatal sıçanlarda H/R modeli uygulanmıştır. NEK grubunda grade 3 ve 4 (3.28-0.32) derece ağır hasar saptanmıştır. MPO; immunohistokimyasal olarak çalışılmıştır. Ağır hasar saptanan grupta MPO aktivitesi, 65.85 ± 9.46 , orta derece hasar saptanan grupta ise 34.33 ± 0.41 , kontrol grubunda ise 6.00 ± 1.32 olarak saptanmıştır.

Musemeche ve ark (242) deneysel nekrotizan enterokolitte PMN'lerin patogenezdaki rolünün araştırıldığı çalışmada, bağırsak dokusunda MPO aktivitesi nötropeni oluşturulan grupta (0.0034 ± 0.0017 U/g doku - 0.0075 ± 0.0012 U/g doku) anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Ceylan ve ark (272) H/R hasarı ile oluşturulan deneysel NEK çalışmasında, MDA düzeyi H/R grubunda (33,84-15,95 nmol/gr protein) kontrol grubundan (16.71 ± 2.89) anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. MPO aktivitesi ise H/R grubunda ($12.36 \pm$

2.26 mU/gr protein) kontrol grubundan (6.00 ± 1.07) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Özdemir ve ark (261) çalışmasında, bağırsak MDA düzeylerinin değerlendirilmesi için TBARS ölçümü yapılmıştır. Gruplar arası anlamlı fark olmamasına karşın MDA düzeyleri H/R grubunda diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur.

Özkan ve ark (292) çalışmasında, doğum sonrası rasgele seçilmiş 30 adet yavru sıçan kendi aralarında üç eşit gruba bölünmüştür. Grup 1 kontrol, Grup 2 H/R ve grup 3 leptin ve H/R grubu olarak belirlenmiştir. Grup 3'teki yavru sıçanlara deneysel işlemden 1 saat önce ciltaltı enjeksiyonla 20 mikrogram/kg leptin verilmiştir. Grup 2 ve 3'de MDA düzeyleri farksız bulunmuştur ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre ise anlamlı artış saptanmıştır.

Ozen ve ark (293) çalışmasında, genç fareler üç gruba ayrılmıştır. Grup 1 H/R grubu, Grup 2 H/R ve rekombinant insan IGF-1 (1 mcg/g yedi gün tedavi alan) ve Grup 3 kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Bağırsak örneklerinde TBARS düzeyleri (nmol/gr doku) Grup 1'de 0.74 (0.21), Grup 2'de 0.81 (0.2) ve Grup 3'de 0.43 (0.21) bulunmuştur.

Aydemir ve ark (294) çalışmasında Evre II ve III NEK olan grupta total oksidan durumu düzeyi ve oksidatif stres indeksi en yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda; MPO aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Kontrol (Grup 1) grubuna göre yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) grupta MPO aktivitesi anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca nötropenik grup (Grup 4) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark saptandı. Bu sonuçlar nötrofiller aktive olduğunda artan MPO düzeyinin hasardan sorumlu olduğunu, G-CSF tedavisinin MPO düzeylerinde artışa neden olduğunu, nötropenin koruyucu olduğunu göstermektedir. TBARS düzeyleri ise kontrol grubuna göre tüm diğer gruplarda anlamlı olarak artmıştı. Ancak Grup 3 'de en yüksek düzeye ulaşmıştı.

NEK patogenezinde dokuda ve dolaşımdaki pro-inflamatuvar sitokinlerin artışı rol oynamaktadır. Buna ek olarak TNF- α , IL-6 ve IL-8 düzeyleri ile hastalık derecesi ve kısa dönem sağkalım arasında ilişki gösterilmiştir. Morecroft ve ark (295) çalışmasında 18 NEK hastasının tanı anında IL-6 düzeyleri ölçülmüştür. Evre III NEK olgularında IL-6 düzeyleri (ortalama 3.127 pg/mL, %95 CI 1.809 -4.445 pg/mL), Evre

II olgularla (ortalama 0.127 pg/mL, %95 CI 0.10-0.329 pg/mL) karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.01). Lodha ve ark (296) çalışmasında ileriye dönük olarak 40 yenidoğanda pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri ölçülmüş ve nörogelişimsel sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Sitokin düzeyleri beslenme intoleransının başlangıcında (Grup 2, n=17) ya da NEK (Grup 3, n=10) ve kontrol grubunda 2-3. haftada (Grup 1, n=13) ölçülmüştür. Nörogelişimsel sonuçlar 24-48. aylarda değerlendirilmiştir. Serum IL-6 düzeyi Grup 3'de yüksek bulunmuştur (p=0.03). Grup 2 olguların %12'sinde ve Grup 3 olguların %20'sinde anlamlı gelişimsel gerilik bulunurken kontrol grubunda gelişimsel gerilik bulunmamıştır. Varyasyon çok olmasına karşın anormal kognitif ve psikomotor gelişim sonuçları olan infantlarda sitokin düzeyleri yüksek bulunmuştur. Normal infantlarda (n=26) IL-6 düzeyi 113.4 ± 393.1 pg/mL, anormal infantlarda (n=14) 88.4 ± 208.6 pg/mL bulunmuştur .

Kumral ve ark (265) çalışmasında kontrol grubunda (grup 1) IL-6 düzeyi 19.4 ± 2.0 pg/mg protein, NEK grubunda (grup 2) 37.1 ± 3.0 pg/mg protein ve NEK+ aktive protein C uygulananan grupta (grup 3) 22.7 ± 2.1 pg/mg protein bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da, Grup 3, 4, 5 kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Nötropenik grupta da artış olması nedeniyle IL-6 salınımı için nötrofil dışında da bazı faktörlerin etkili olduğu söylenebilir.

TLR intraluminal bakterileri tanıyan patern tanıma reseptörleridir. TLR genelde lenfosit ve fagosit gibi immün hücrelerde eksprese olurken koruma bariyeri oluşturan epitelyal hücrelerde de ekspresyonu görülmektedir. TLR patojenlerin varlığı için nöbetçi görevi görmekte ve immün sistemi aktive edebilmektedir. Yangısal yanıtı başlatarak patojenlere karşı ilk mukozal savunmayı oluşturması yanısıra konak yararına olan komensal mikroorganizmaların tolere edilmesini sağlayıcı koruyucu sinyaller sağlamaktadır. Deneysel NEK modelinde gram negatif lipopolisakkaridleri tanıyan TLR4 ekspresyonu bulunmuştur (116). TLR4 eksikliği olan C3H/HcJ fareler NEK gelişiminden korunmaktadır (117). Liu ve ark (297) çalışmasında aktif TLR sinyalizasyonunun NEK'te ortaya çıkan histolojik yanıtın önce gelip gelmediği araştırılmıştır. Yenidoğan sıçan yavruları dört gruba ayrılmıştır: kontrol, hipoksik kontrol, mama ile beslenen, mama ile beslenen ve hipoksik. Çalışmanın 24, 48, 72 ve 120. saatlerinde ileal dokular NEK skorları ile değerlendirilmiştir. Lokalize bağırsak TLR saptanması için real-time reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ve immünohistokimya kullanılmıştır. Dört grup içinde ileum hasarı mama ile beslenen ve

hipoksik olan grupta 72 saat sonra gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre NEK grubunda selektif TLR mRNA indüksiyonu gösterilmiştir. Tüm TLR değişiklikleri 48. saatte histolojik değişiklikler ortaya çıkmadan başlamıştır. Th1-tipi sitokinler (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) ve Th2-tipi sitokinler (IL-4, IL-5 ve IL-13) NEK'te anlamlı olarak artmıştır. Sitokinlerin artışı ve bağırsakta TLR ekspresyonu histolojik hasardan önce ortaya çıkmıştır.

Gelişmekte olan fare bağırsağında TLR4 ve TLR9 reseptör ekspresyonları gösterilmiştir (298). İnsan ve deneysel hayvan modellerinde NEK artmış bağırsak TLR4 ve azalmış TLR9 ekspresyonu ile ilişkilidir. NEK'in gram negatif bakteri kolonizasyonu sonucu ortaya çıktığı gözleminden sonra birçok laboratuvar TLR4'ün patogenezdaki yerini çalışmıştır. Caplan ve arkadaşları (116) 2006 yılında TLR4 mutasyonu olan farelerin NEK gelişiminden korunduğunu göstermiştir. TLR4 sinyalizasyonunun hasar ve onarım arasındaki dengeyi düzenlediği gösterilmiştir. Enterositteki TLR4 aktivasyonu apoptoz yolu ile hücre ölümüne yol açmaktadır (299). Bağırsakta TLR4 aktivasyonunun enterosit çoğalmasını azaltarak mukozal iyileşme kapasitesini azalttığı gösterilmiştir (300). TLR4 reseptör aktivasyonu ayrıca enterosit migrasyonunu azaltmaktadır (301). Tüm bu bulguların sonucunda TLR4 aktivasyonunun bağırsak hasarını arttırdığı ve mukozal onarım kapasitesini azalttığı sonucuna varılmıştır.

Wolfs ve ark (302) çalışmasında TLR4 düzenleyici molekülü olan MD-2'nin immatür infant bağırsağında yokluğu bakteri saptanmasını azaltmakta ve prematür bağırsakta mikrobiyal kolonizasyon ile NEK'e yatkınlık oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda; TLR4 düzeyleri arasında gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (P=0,03). Kontrol grubu (Grup 1) ile düşük doz G-CSF (Grup 2) ve yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) gruplar arasında anlamlı fark saptandı. NEK grubunda (Grup 5) kontrol grubuna göre artış saptandı. Ancak anlamlı fark saptanamadı. TLR4 düzeyinin en fazla Grup 3 saptandı. Bunun nedeni, sadece H/R TLR4 düzeyini yeteri kadar artıramamasından kaynaklanabilir.

Kitotriozidaz aktive makrofajlar tarafından sentezlenen bir kitinazdır. Kitotriozidaz birçok lizozomal hastalıkta makrofaj aktivasyonunun biyokimyasal belirteci olarak kullanılmaktadır. Pre-eklamptik gebelerde, kitotriozidaz aktivitesini maternal ve kord serumunda, normallere göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (249). İn vitro şartlarda, granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktörün (GM-CSF)

insan PMN'lerinden kitotriozidaz salınımını arttırdığı saptanmıştır. Bu, daha sonra GM-CSF tatbik edilen sağlıklı bireylerin seri plazma örneklerinin analizi ile de doğrulanmıştır (247). Ancak, akut reaktif proteinden çok kronik bir inflamatuvar belirteç olarak kabul edilmektedir (248). NEK ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda, G-CSF verilen ve H/R uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmıştır. Sadece H/R uygulanan fare grubunda artış olmakla birlikte anlamlı fark saptanmamıştır. Tedavisiz NEK grubunda anlamlı artış saptanamamasının nedeni olarak Kitotriozidaz'ın salınımı için kronik inflamatuvar süreç gereksinimi olabilir. G-CSF verilen gruplarda; artmış nötrofil sayısı, aktive nötrofil ve makrofajlardan kitotriozidaz salınımının artması nedeniyle yüksek saptandığı düşünülmüştür. Bunların sonucunda, Kitotriozidaz'ın NEK'te yeni bir inflamatuvar belirteç olarak kullanılması gündeme gelebilir.

NEK patogenezinde inflamasyon ve oksidasyon reaktif nitrojen ürünleri oluşması, protein oksidasyonu ve DNA hasarı yolları ile önemli rol oynamaktadır. PARP-1 nikotinamid adenein dinükleotidi (NAD+) substrat olarak kullanarak DNA onarımını kolaylaştıran kritik bir enzimdir. Ancak, ciddi oksidatif stres ve DNA hasarı varlığında PARP-1 enziminin çok fazla aktive olması hücredeki NAD+ ve ATP depolarını bitirerek hücrenin metabolik ölümüne neden olabilir (225). Giannone ve ark (303) çalışmasında deneysel sıçan NEK modelinde, bağırsak epitel hücrelerindeki nitrik oksid disregülasyonunun belirgin PARP-1 ekspresyonuna neden olduğu ve PARP-1 inhibitörü (nikotinamid) verilmesinin bağırsak hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubunda yüksek dereceli NEK gelişme oranı %56 iken PARP inhibitörü uygulanan grupta %7 bulunmuştur. Çalışmamızda, nötropenik grup (grup 4) dışında tüm gruplarda PARP düzeyinde anlamlı artış saptandı. H/R uygulanan tüm gruplar arasında en yüksek düzey 3. grupta saptandı. Nötropeni yapılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. Ancak G-CSF uygulanan gruplarla arasında anlamlı fark saptandı. Bu sonuçlar PARP ekspresyonunda nötrofillerin ve G-CSF uygulamasının önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda yüksek doz G-CSF+H/R uygulanan grupta histopatolojik hasar ve apoptoz diğer gruplardan daha fazla olarak saptandı. NEK patogenezinde önemli rol oynayan doku nötrofil infiltrasyonu, aktive nötrofillerden salınan MPO ve

kitotriozidaz aktivitesinin G-CSF ile arttığı gösterildi. PARP, IL-6, TLR4 düzeyleride nötrofil sayısı ve/veya G-CSF tedavisinden etkilendiği gösterildi.

Sonuç olarak; nötrofiller NEK patogenezinde hasardan sorumlu önemli bir faktördür. Nötropeni hasarın artışı için koruyucu bir mekanizma olabilir. Klinikte nötropeni nedeniyle riskli prematüre bebeklere G-CSF uygulamak NEK için bir risk faktörü olabilir. Kitotriozidaz ve PARP NEK için belirteç olarak kullanılabilir. Ancak tüm bunların desteklenmesi için klinik çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

1. HE ile boyalı preperatlarda kontrol grubunda (Grup 1); bağ ve epitel dokusundaki hücreler normal histolojik görünümde olarak saptandı.
2. HE ile boyalı preperatlarda Grup 2'de; villusların apekslerinde yer yer hücrel kayıp ve submukozal ödem ve özellikle bez epitel dokusunda yüksek prizmatik epitel hücrelerinin arasında mitotik figürler saptandı..
3. HE ile boyalı preperatlarda Grup 3'de; epitel hücrelerinde azalma, dökülme, ayrışmalar saptandı. Villusların lamina propriasında hücrel anlamda yoğunluk ve bağ dokusu hücrelerinde artış (+++) ve intersellüler ödem görüldü.
4. HE ile boyalı preperatlarda Grup 4'de; yer yer künt görülen villuslar ve submukozal ödem (+) saptandı.
5. HE ile boyalı preperatlarda Grup 5'de; villuslarda yer yer epitelial dökülme ve ayrılmalar tanımlandı. Submukozal ödem (++) ve ileum villuslarında bağ dokusu hücrelerinde artış saptandı (++).
6. Bağ dokusu için yapılan Mallory Azan boyalı preperatlarda; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Özellikle Grup 5'de belirgin olan ödem, staz bulguları ile uyumlu olarak kümeleşme ve dağılımları saptandı.
7. Sudan Black boyalı preperatlarda; lamina propria da Grup 1'e göre Grup 3'de daha belirgin olmak üzere hücrel infiltrasyon (nötrofil) saptandı.
8. TUNEL ile boyanmış preperatlarda, Grup 2'de Tunel (+) hücre, Grup 3'de ise Tunel (+++) hücre, Grup 4'de (+), Grup 5'de ise Tunel (++) hücre görüldü. Grup 1'de yüzey ve bez epitel dokuları taranan preperatlarda her iki dokuyu oluşturan hücrelerde olağan gelişimsel yapı ile uyumlu apoptotik hücreler saptandı.
9. Mikroskobik hasar skorlamasına göre; epitel için Grup1:0, Grup2:9, Grup3:16, Grup 4:8, Grup 5: 10 puan aldı. En yüksek hasarın Grup 3' de olduğu saptandı.
10. Mikroskobik hasar skorlamasına göre; lamina propria için Grup 1:0, grup 2:4, Grup 3:8, grup 4:3, Grup 5: 6 puan aldı. En yüksek hasarın Grup 3' de olduğu saptandı.

11. Lökosit sayıları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. ($p=0,001$). Grup 3 yavru farelerde, lökosit sayıları anlamlı artış ($p=0,009$) gösterirken nötropenik grupta (Grup 4) anlamlı azalma ($p=0,001$) saptandı.
12. Absolü nötrofil sayıları açısından gruplar arası anlamlı fark bulundu. ($p=0,001$). Kontrol grubuna göre (Grup 1) Grup 3'de anlamlı artış ($p=0,04$) saptanırken, nötropenik (Grup 4) grupta anlamlı azalma ($p=0,001$) saptandı.
13. TBARS değerleri açısından gruplar arası anlamlı fark bulundu. ($p=0,007$). TBARS düzeyleri kontrol (Grup 1) grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı olarak artmış saptandı. En yüksek düzey yüksek doz G-CSF (Grup 3) grubunda saptandı.
14. MPO aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,04$). Kontrol (Grup 1) grubuna göre yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) grupta MPO aktivitesi anlamlı yüksek bulundu ($p=0,021$).
15. MPO aktivitesi açısından, nötropenik grup (Grup 4) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark saptandı. ($p=0,003$)
16. Kitotriozidaz aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulundu. ($p=0,02$). Kontrol (Grup 1) grubu ile düşük doz G-CSF grubu (Grup 2) arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,02$).
17. Kontrol (Grup 1) grubu ile yüksek doz G-CSF grubu (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,003$). Kitotriozidaz aktivitesi en yüksek Grup 3'de saptandı.
18. IL-6 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklı bulundu. ($p=0,02$). Kontrol grubu (Grup 1) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu. ($p=0,006$). IL-6 düzeyi aktivitesi en yüksek Grup 3'de saptandı.
19. IL-6 düzeyleri açısından, kontrol grubu (Grup 1) ile nötropenik grup (Grup 4) arasında anlamlı fark bulundu. ($p=0,003$). Kontrol grubu (Grup 1) ile tedavisiz NEK (Grup 5) arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,006$).

20. TLR4 düzeyleri; gruplar arasında anlamlı farklı bulundu ($p=0,03$). Kontrol grubu (Grup 1) ile düşük doz G-CSF grubu (Grup 2) arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,03$).
21. TLR4 düzeyleri için, kontrol grubu (Grup 1) ile yüksek doz G-CSF uygulanan (Grup 3) arasında anlamlı fark bulundu ($P=0,02$). TLR4 düzeyi en fazla Grup 3'de saptandı.
22. PARP düzeyleri için gruplar arasında anlamlı farklı bulundu ($p=0,001$).
23. PARP düzeyleri için, nötropeni yapılan (Grup 4) grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p=0,62$).
24. PARP düzeyi açısından düşük doz G-CSF (Grup2) uygulanan grupla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p= 0,01$).
25. PARP düzeyi açısından sadece H/R uygulanan (Grup 5) gruba göre yüksek doz G-CSF (Grup 3) uygulanan fareler arasında da anlamlı fark bulunmadı ($p= 0,20$). Ancak, H/R uygulanan tüm gruplar arasında en yüksek düzey grup 3'de saptandı.
26. PARP düzeyi açısından, Grup 4 ile Grup 5 arasında anlamlı fark saptandı ($P= 0,004$)

KAYNAKLAR

1. Caplan M. Necrotising enterocolitis and short bowel syndrome. Chapter 73 In: Avery's Diseases of the Newborn, ninth edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012; 1022-1029.
2. Bolisetty S, Lui K. Necrotizing enterocolitis in full-term neonates. *J Paediatr Child Health*. 2001; 37(4):413-4.
3. Ryder RW, Shelton JD, Guinan ME. Necrotizing enterocolitis: a prospective multicenter investigation. *Am J Epidemiol*. 1980;112(1):113-23.
4. Stoll BJ, Kanto WP, Glass RI. Epidemiology of necrotising enterocolitis: a case control study. *J Pediatr* 1980;96:447-451.
5. Lianos AR, Moss ME, Pinzon MC. Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002;16:342-349.
6. Gutrie SO, Gordon PV, Thomas V. Necrotising enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol* 2003;23:278-285
7. Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU network: 1996-1997. 2000;106:1070-1079
8. Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ. The epidemiology of necrotising enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health* 1997;87:2026-2031
9. Luig M, Lui K. Epidemiology of necrotising enterocolitis II. Risks and susceptibility of premature infants during the surfactant era: a regional study. *J Paediatr Child Health* 2005;41:174-179
10. Henry MC, Lawrence Moss R. Surgical therapy for necrotising enterocolitis: bringing evidence to the bedside. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:181-190
11. Clark RH, Gordon P, Walker WM, Laughon M, Smith PB, Spitzer AR. Characteristics of patients who die of necrotizing enterocolitis. *J Perinatol*.2012; 32(3):199-204.
12. Swanson JR, Attridge JT, Gordon PV. Potential confounder of NEC clinical trials. *J Perinatol*. 2009;29(3):256-7.

13. Petty JK, Ziegler MM. Operative strategies for necrotising enterocolitis: the prevention and treatment of short bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:191-198.
14. Sadler TW. Digestive system, In :Langman's medical embryology, 11th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2010; 209-234.
15. Balckburn ST. Maternal, fetal and neonatal physiology: a clinical perspective 3rd ed Sti Louis (Mo), Saunders Elsevier 2007
16. Grave DD, Nelson SA, Walker WA. New therapies and preventive approaches for necrotising enterocolitis: report of a research planning workshop. *Pediatr Res* 2007;62:510-514.
17. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.*2008 ;32(2):100-6.
18. Sase M, Lee JJ, Park JY. Ontogeny of fetal rabbit upper gastrointestinal motility. *J Surg Res* 2001;101:68-72.
19. Sase M, Miwa I, Sumie M. Ontogeny of gastric emptying patterns in the human fetüs. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;17:213-217.
20. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1028-1034.
21. AlTawil Y, Berseth CL. Gestational and postnatal maturation of duedonal motor responses to intragastric feding. *J Pediatr* 1996;129:374-381.
22. Sase M, Lee JJ, Ross MG. Effect of hypoxia on fetal rabbit gastrointestinal motility. *J Surg Res* 2001;99:347-351.
23. Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics* 1992;90:669-673.
24. Lebenthal A, Lebenthal E. The anatomy of the small intestine epithelium *JPEN. J Parenter Enteral Nutr* 1999;23:3-6.
25. Lin J. Too much short chain fatty acids cause neonatal necrotising enterocolitis. *Med Hypotheses* 2004;62:291-293.
26. Ostlie DJ, Spilde TL, St Peter SD. Necrotising enterocolitis in fullterm infants. *J Pediatr Surg* 2003;38:1039-1042.
27. Scholander PF. The master switch of life. *Sci Am* 1963;209:92-106.

28. Gosche JR, Harris PD, Garrison RN. Age-related differences in intestinal microvascular responses to low-flow states in adult and suckling rats. *Am j Physiol* 1993;264:447-453.
29. Chun K, Drugas G, Ferguson D. Intestinal villus microcirculatory response to hemorrhage in adult and immature rats. *J Pediatr Surg* 1992;27:322-327.
30. Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation, physiology and pathophysiology. *Clin Perinatol* 2002;29:23-29.
31. Akisu M, Ozmen D, Baka M. Protective effect of dietary supplementation with L-arginine and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002;81:260-265.
32. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001;292:1115-8.
33. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulations of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am j Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:851-857 .
34. Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am j Physiol* 1999;277:351-358.
35. Buisine MP, Devisme L, Savidge TC. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* 1998;43:519-524.
36. Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update. *Acta Paediatr Suppl* 2005;94:100-105.
37. Peine-Spoel M, Albers MJ. Intestinal permeability in newborns with necrotizing enterocolitis and controls: does the sugar absorption test provide guidelines for the time to (re-)introduce enteral nutrition? *J Pediatr Surg* 2001;36:587-592.
38. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2004;55(4):622-9.
39. Clark JA, Doelle SM, Halpern MD, Saunders TA, Holubec H, Dvorak K, Boitano SA, Dvorak B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:38-49.

40. Liu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestine, and pediatric diseases. *Acta Paediatr* 2005;94:386-393.
41. Upperman JS, Potoka D, Grishin A. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:159-166.
42. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:49-57.
43. Shin CE, Falcone RA. Diminished epidermal growth factor levels in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2000;35:173-176.
44. Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol* 2003;38:717-726.
45. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710-720.
46. Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:82-88.
47. Chen H, Xu Z, Peng L. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* 2006;27:931-940.
48. Eckmann L. Defense molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:147-151.
49. Touloukian RJ, Posch JN, Spencer R. The pathogenesis of ischemic gastroenterocolitis of the neonate: selective gut mucosal ischemia in asphyxiated neonatal piglets. *J Pediatr Surg*. 1972;7(2):194-205.
50. Nowicki PT, Miller CE, Haun SE. Effects of arterial hypoxia and isoproterenol on in vitro postnatal intestinal circulation. *Am J Physiol*. 1988;255:1144-8.
51. Nowicki PT, Dunaway DJ, Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM, Hammond SB, Besner GE, Caniano DA. Endothelin-1 in human intestine resected for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 2005;146(6):805-1.
52. Nowicki PT, Caniano DA, Hammond S, Giannone PJ, Besner GE, Reber KM, Nankervis CA. Endothelial nitric oxide synthase in human intestine resected for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 2007;150(1):40-5.

53. Nowicki PT, Minnich LA. Effects of systemic hypotension on postnatal intestinal circulation: role of angiotensin. *Am J Physiol.* 1999;276(2):341-52
54. Davey AM, Wagner CL, Cox C, Kendig JW. Feeding premature infants while low umbilical artery catheters are in place: a prospective, randomized trial. *J Pediatr.* 1994;124:795-9.
55. Cassady G, Crouse DT, Kirklin JW, Strange MJ, Joiner CH, Godoy G, Odrezin GT, Cutter GR, Kirklin JK, Pacifico AD, et al. A randomized, controlled trial of very early prophylactic ligation of the ductus arteriosus in babies who weighed 1000 g or less at birth. *N Engl J Med.* 1989;320(23):1511-6.
56. Fowlie PW. Intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD000174. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3):CD000174.
57. Kilic N, Büyükunal C, Dervisoglu S, Erdil TY, Altioek E. Maternal cocaine abuse resulting in necrotizing enterocolitis. An experimental study in a rat model. II. Results of perfusion studies. *Pediatr Surg Int.* 2000;16(3):176-8.
58. Mally P, Golombek SG, Mishra R, Nigam S, Mohandas K, Depalhma H, LaGamma EF. Association of necrotizing enterocolitis with elective packed red blood cell transfusions in stable, growing, premature neonates. *Am J Perinatol.* 2006 ;23(8):451-8.
59. Piena-Spoel M, Albers MJ, ten Kate J, Tibboel D. Intestinal permeability in newborns with necrotizing enterocolitis and controls: Does the sugar absorption test provide guidelines for the time to (re)introduce enteral nutrition? *J Pediatr Surg.* 2001;36(4):587-92.
60. Clark JA, Doelle SM, Halpern MD, Saunders TA, Holubec H, Dvorak K, Boitano SA, Dvorak B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291(5):G938-49.
61. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007;19(2):70-83.

62. Shi L, Zhang BH, Yu HG, Yu JP, Xi JL. Intestinal trefoil factor in treatment of neonatal necrotizing enterocolitis in the rat model. *J Perinat Med* 2007;35(5):443-6.
63. Kuo S, El Guindy A, Panwala CM, Hagan PM, Camerini V. Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. *Pediatr Res* 2001;49(4):543-51.
64. Eibl MM, Wolf HM, Fürnkranz H, Rosenkranz A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *N Engl J Med*. 1988;319(1):1-7.
65. Scholtens PA, Alliet P, Raes M, Alles MS, Kroes H, Boehm G, Knippels LM, Knol J, Vandenplas Y. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *J Nutr*. 2008;138(6):1141-7.
66. Yen CC, Lin CY, Chong KY, Tsai TC, Shen CJ, Lin MF, Su CY, Chen HL, Chen CM. Lactoferrin as a natural regimen for selective decontamination of the digestive tract: recombinant porcine lactoferrin expressed in the milk of transgenic mice protects neonates from pathogenic challenge in the gastrointestinal tract. *J Infect Dis*. 2009;199(4):590-8.
67. Neu J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action. *J Nutr*. 2001;131:2585S-9S
68. Halpern MD, Holubec H, Clark JA, Saunders TA, Williams CS, Dvorak K, Dvorak B. Epidermal growth factor reduces hepatic sequelae in experimental necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate*. 2006;89(4):227-35
69. Feng J, El-Assal ON, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg*. 2006;41(1):144-9.
70. Claud EC, Savidge T, Walker WA. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res*. 2003;53(3):419-25.
71. Ozen S, Akisu M, Baka M, Yalaz M, Sozmen EY, Berdeli A, Kultursay N. Insulin-like growth factor attenuates apoptosis and mucosal damage in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Biol Neonate*. 2005;87(2):91-6.

72. Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg*. 2000;35(2):178-81.
73. Carlson SE, Montalto MB, Ponder DL, Werkman SH, Korones SB. Lower incidence of necrotizing enterocolitis in infants fed a preterm formula with egg phospholipids. *Pediatr Res*. 1998;44(4):491-8
74. Lu J, Jilling T, Li D, Caplan MS. Polyunsaturated fatty acid supplementation alters proinflammatory gene expression and reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2007;61(4):427-32.
75. Akisu M, Girgin FK, Baka M, Hüsseyinov A, Kultursay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2001;11:167-172.
76. Pritchard JA. Deglutition of normal and anencephalic fetuses. *J Obstet Gynaecol* 1965;25:289-97.
77. Mulvihill SJ, Stone MM, Debas HT. The role of amniotic fluid in fetal nutrition. *J Pediatr Surg* 1985;20:668-72.
78. Sangild PT, Schmidt M, Elnif J. Prenatal development of gastrointestinal function in the pig and the effects of fetal esophageal obstruction. *Pediatr Res* 2002;52:416-24
79. Cho CK, Shan SJ, Winsor EJ. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1406-15
80. Wagner CL. Amniotic fluid and human milk: a continuum of effect? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:513-4
81. Underwood MA, Gilbert WM. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005;25:341-8
82. Sangild PT, Mei J, Fowden AL. The prenatal porcine intestine has low transforming growth factor-beta ligand and receptor density and shows reduced trophic response to enteral diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;206:1053-62

83. Yoshio H, Tollin M. Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr Res* 2003;53:211-6
84. Siggers JL, Siggers RH. Oral administration of amniotic fluid reduces necrotising enterocolitis in preterm pigs. *Gastroenterology* 2008;134:259
85. Willis DM, Chabot J, Radde IC, Chance GW. Unsuspected hyperosmolality of oral solutions contributing to necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight infants. *Pediatrics*. 1977;60(4):535-8
86. Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatr Res*. 2005;57(2):201-4
87. Halpern MD, Holubec H, Saunders TA, Dvorak K, Clark JA, Doelle SM, Ballatori N, Dvorak B. Bile acids induce ileal damage during experimental necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology*. 2006;130(2):359-72
88. Tyson JE, Kennedy KA. Minimal enteral nutrition for promoting feeding tolerance and preventing morbidity in parenterally fed infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000504
89. Berseth C.L., Bisquera J.A., Paje V.U. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003; 111:529-534.
90. Burrin DG, Stoll B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clin Perinatol* 2002;29:65-96
91. Burrin DG, Stoll B, Jiang RH. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough? *Am J Clin Nutr* 2000;71:1603-10
92. Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr* 2007;85:6295-345
93. Clayton PT, Whitfield P. The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition. *Nutrition* 1998;14:158-64
94. Kelly DA. Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? *Gastroenterology* 2006;130:70-7

95. Berseth CL. Minimal enteral feedings. *Clin Perinatol* 1995;22:195-205
96. Gordon PV, Swanson JR, Attridge JT. Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? *J Perinatol* 2007;27:661-671.
97. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003;91:48-55.
98. Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM. Duedonal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotising enterocolitis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4539-4547
99. Dela Cochetiere MF, Piloquet H, des Robert C. Early intestinal bacterial colonization and necrotising enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 2004;56:366-370.
100. Claud EC, Lu L, Antom PM. Developmentally regulated kappaB expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7404-7408
101. Claud EC, Savidge T, Walker WA. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* 2003;53:419-425.
102. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;80(3):F167-73.
103. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007 ;5(7):e177.
104. Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, Petrof EO, Sun J, Antonopoulos DA, Chang EB, Claud EC. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* 2009 ;3(8):944-54.
105. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 2003 Jan 22;85(2):85-95.
106. Gribar SC, Richardson WM, Sodhi CP, Hackam DJ. No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med.* 2008 ;14:645-59.

107. Caplan MS, Hsueh W. Necrotizing enterocolitis: role of platelet activating factor, endotoxin, and tumor necrosis factor. *J Pediatr.* 1990;117:47-51.
108. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 1999;103:766-71.
109. Harris MC, Costarino AT Jr, Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L, Butler S, Kilpatrick L. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1994;124:105-11.
110. Langer JC, Sohal SS, Mumford DA. Mucosal permeability in the immature rat intestine: effects of ischemia-reperfusion, cold stress, hypoxia, and drugs. *J Pediatr Surg* 1993;28:1380-3.
111. Deitch EA, Xu DZ, Qi L, Berg RD. Bacterial translocation from the gut impairs systemic immunity. *Surgery.* 1991;109:269-76.
112. Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. Physiology and pathophysiology. *Clin Perinatol.* 2002;29:23-39.
113. Nanthkumar N, Meng D, Goldstein AM, Zhu W, Lu L. The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune responses *Plos One* 2011;21:17776
114. Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins.* 1990; 39(6):705-14.
115. De Plaen IG, Liu SX, Tian R, Neequaye I, May MJ, Han XB, Hsueh W, Jilling T, Lu J, Caplan MS. Inhibition of nuclear factor-kappaB ameliorates bowel injury and prolongs survival in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2007;61(6):716-21
116. Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, Thomson RB, Soliman A, Arditi M, Caplan MS. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol.* 2006;177:3273-82.
117. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, Dubowski TD, Sodhi CP, Hackam DJ. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol.* 2007;179(7):4808-20.

118. Lin WP, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol* 2008;32:70-82.
119. Zeng H, Wu H, Sloane V. Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:96-108.
120. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ. Signal-induced site-specific phosphorylation targets 1 kappa B Alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995;9:1586-1597 .
121. Ford H, Watkins S, reblock K. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997;32:275-282
122. Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, Glass RI. The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health.* 1997;87(12):2026-31.
123. Young C, Sharma R, Handfield M, Mai V, Neu J. Biomarkers for infants at risk for necrotizing enterocolitis: clues to prevention? *Pediatr Res.* 2009;65:91R-97R.
124. Banyasz I, Bokodi G, Vasarhelyi B. Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:266-270.
125. Rhoads JM, Chen W, Gookin J. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut* 2004;53:514-522.
126. Wu G, Jaeger LA, Bazer FW. Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications *J Nutr Biochem* 2004;15:442-451.
127. Becker RM, Wu G, Galanko JA. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2000;137:785-793.
128. Moomen RM, Paulussen AD, Souren NY. Carbonyl phosphate synthetase polymorphisms as a risk factor for necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2007;62:188-190.
129. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.* 1978;187(1):1-7.

130. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am.* 1986;33(1):179-201.
131. Molik KA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Portal venous air: the poor prognosis persists. *J Pediatr Surg.* 2001;36(8):1143-5.
132. Bohnhorst B, Müller S, Dördelmann M, Peter CS, Petersen C, Poets CF. Early feeding after necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr.* 2003;143(4):484-7.
133. Dördelmann M, Rau GA, Bartels D, Linke M, Derichs N, Behrens C, Bohnhorst B. Evaluation of portal venous gas detected by ultrasound examination for diagnosis of necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94(3):183-7.
134. Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med.* 1984;310(17):1093-103.
135. Badowicz B, Latawiec-Mazurkiewicz I. Necrotising enterocolitis (NEC)-methods of treatment and outcome: a comparative analysis of Scottish (Glasgow) and Polish (Western Pomerania) cases. *Eur J Pediatr Surg.* 2000;10(3):177-81.
136. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet.* 2006;368:1271-83.
137. Blakely ML, Tyson JE, Lally KP, McDonald S, Stoll BJ, Stevenson DK et al NICHD Neonatal Research Network. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation in extremely low birth weight infants: outcomes through 18 months adjusted age. *Pediatrics.* 2006;117(4):680-7.
138. Moss RL, Dimmitt RA, Henry MC, Geraghty N, Efron B. A meta-analysis of peritoneal drainage versus laparotomy for perforated necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2001;36:1210-3.
139. Rees CM, Eaton S, Kiely EM, Wade AM, McHugh K, Pierro A. Peritoneal drainage or laparotomy for neonatal bowel perforation? A randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2008;248:44-51.
140. Horwitz JR, Lally KP, Cheu HW, Vazquez WD, Grosfeld JL, Ziegler MM. Complications after surgical intervention for necrotizing enterocolitis: a multicenter review. *J Pediatr Surg.* 1995;30:994-8.

141. Galea MH, Holliday H, Carachi R, Kapila L. Short-bowel syndrome: a collective review. *J Pediatr Surg.* 1992 ;27:592-6.
142. Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF et al. NICHD Neonatal Research Network. Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 2005;115:696-703.
143. Schulzke SM, Deshpande GC, Patole SK. Neurodevelopmental outcomes of very low birthweight infants with necrotising enterocolitis: a systematic review of observational studies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007;161:583-590
144. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS, Meza YG. Rat milk decreases necrotizing enterocolitis in a rat model. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:471-3.
145. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg.* 1974;9:587-95.
146. Merlob P, Litmanovitch I, Mor N, Litwin A, Wielunsky E. Necrotizing enterocolitis after intravenous immunoglobulin treatment for neonatal isoimmune thrombocytopenia. *Eur J Pediatr.* 1990;149:432-3.
147. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology.* 1999;117:577-83.
148. Siggers RH, Siggers J, Boye M, Thymann T, Mølbak L, Leser T et al. Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet-induced gut dysfunction and severity of necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *J Nutr* 2008;138(8):1437-44.
149. Lu J, Jilling T, Li D, Caplan MS. Polyunsaturated fatty acid supplementation alters proinflammatory gene expression and reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 2007 ;61:427-32
150. Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Lickerman M, Hsueh W. The platelet-activating factor receptor antagonist WEB 2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24(3):296-301.

151. Caplan MS, Lickerman M, Adler L, Dietsch GN, Yu A. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 1997;42(6):779-83.
152. Dvorak B, Khailova L, Clark JA, Hosseini DM, Arganbright KM, Reynolds CA, Halpern MD. Comparison of epidermal growth factor and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor for prevention of experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 ;47(1):11-8.
153. Shi L, Zhang BH, Yu HG, Yu JP, Xi JL. Intestinal trefoil factor in treatment of neonatal necrotizing enterocolitis in the rat model. *J Perinat Med* 2007;35(5):443-6.
154. Viscardi RM, Lyon NH, Sun CC, Hebel JR, Hasday JD. Inflammatory cytokine mRNAs in surgical specimens of necrotizing enterocolitis and normal newborn intestine. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1997;17(4):547-59.
155. Cueva JP, Hsueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut.* 1988 Sep;29(9):1207-12.
156. Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH, Butzner JD, Parsons HG, Scott RB. Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr.* 2002;140(4):425-31.
157. Patole S. Strategies for prevention of feed intolerance in preterm neonates: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;18:67-76.
158. Berseth CL. Feeding strategies and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2005;17:170-173.
159. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.*1990;336:1519-23.
160. Quigley M, Henderson G, Anthony M. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database systematic Rev* 2007;4:CD002971.
161. Rumbo M, Schiffrin EJ. Ontogeny of intestinal epithelium immune functions: developmental and environmental regulation. *Cell Moll Life Sci* 2005;62:1288-1296.
162. Neu J, Li N. Pathophysiology of glutamine and glutamate metabolism in premature infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:75-79.

163. McClure RJ. Trophic feeding of the preterm infant. *Acta Paediatr Suppl* 2001;90:19-21.
164. Newell SJ. Enteral feeding of the micropremie. *Clin Perinatol* 2000;27:221-234.
165. Domeneghini C, Di Giancamillo A, Arrighi S. Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives toward humans. *Histol Histopathol* 2006;21:273-283.
166. Shah P, Shah V. Arginine supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;3:CD004339.
167. Dilsiz A, Ciftci I, Aktan TM. Enteral glutamine supplementation and dexamethasone attenuate the local intestinal damage in rats with experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2003;19:578-582.
168. Vaughn P, Thomas P, Clark R. Enteral glutamine supplementation and morbidity in low birth weight infants. *J Pediatr* 2003;142:662-668.
169. Akisü M, Baka M, Hüseyinov A, Kultursay N. The role of dietary supplementation with L-glutamine in inflammatory mediator release and intestinal injury in hypoxia/reoxygenation-induced experimental necrotizing enterocolitis. *Ann Nutr Metab* 2003;47:262-266.
170. Foster J, Cole M. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1:CD001816.
171. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1:CD000361.
172. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci* 1999;4:303-309.
173. Smith LM, Qurshş N, Chao CR. Effects of single and multiple courses of antenatal glucocorticoids in preterm newborns less than 30 weeks' gestation. *J Matern Fetal Med* 2000;9:131-135.
174. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;1:CD001146.

175. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Delayed (>3 weeks) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants Cochrane Database Syst Rev 2003;1:CD001145.
176. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Moderately early (7-14 days) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2003;1:CD001144.
177. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium 'The Intelligent Intestine', held in Paris, June 14. 2002. Am J Clin Nutr 2003;78:675-683.
178. Bin-Nun A, Bromiker r, Wilschanski M. Oral probiotics prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight neonates. J Pediatr 2003;147:192-196.
179. Lin HC, Su BH, Chen AC. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotising enterocolitis in very low birth weight infants Pediatrics 2003;115:1-4.
180. Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R. Effects of oral Lactobacillus GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. j Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36:397-402.
181. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2002;277:50959-50965.
182. Caplan MS. Probiotic and prebiotic supplementation for the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. J Perinatol. 2009;29 Suppl 2:S2-6.
183. Martin CR, Walker WA. Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol. 2008;32(2):127-37.
184. Akisü M, Baka M, Yalaz M, Hüseyinov A, Kültürsay N: Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. Eur J Pediatr Surg 2003; 13: 319-323.
185. Quwehand AC, Derrien M, de Vos W. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. Curr Opin Biotechnol 2005;16:212-217.
186. Knol J, Boehm G, Lidestri M. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. Acta Paediatr Suppl 2005;94:31-33.

187. Bartholome AL, Albin DM, Baker DH. Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunoileal resection in neonatal piglets JPEN. *J Parenter Enteral Nutr* 2004;28:210-222
188. Guillet R, Stoll BJ. Association of H₂-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2006;117:137-42.
189. Pulsifier-Anderson E, Guillet R. National Institute of Health recommends the routine use of H₂ blockers in preterm infants be carefully evaluated Neonatal Netw 2006;25:223-224.
190. Miller MJS, McNeill H, Mullane KM: SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 1988; 255: G556-G565.
191. Cueva JP, Hseueh W: Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988; 29:1207-1212.
192. Akisü M, Özmen D, Baka M, Habif S, Yalaz M, Arslanoğlu S, Kültürsay N, Bayındır O: Protective effect of dietary supplementation with L-Arginine and L-Carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002; 81: 260-265.
193. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15:191-195.
194. Frank L, Groseclose EE. Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res* 1984;18:240-244.
195. Quanungo S, Mukherjea M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;215:11-19.
196. Lurie S, Matas Z, Boaz M. Different degrees of fetal oxidative stress in elective and emergent cesarean section. *Neonatology* 2007;92:111-115.
197. Shah MD, Shah SR. Nutrient deficiencies in the premature infant. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1069-1083.

198. Than NG, Romero R, Tarca AL. Mitochondrial manganese superoxide dismutase mRNA expression human chorioamniotic membranes and its association with labor, inflammation, and infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:1000-1013.
199. Vento M, Aguar M, Escobar J. Antenatal steroids and antioxidant enzyme activity in preterm infants: influence of gender and timing. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2945-2955.
200. Lee JW, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr* 2011;22:161-166.
201. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:335-347.
202. Perrone S, Tataranno ML, Negro S. Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Hum Dev* 2010;86:241-244.
203. Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen O. The Alabama Preterm Birth Project: placental histology in recurrent spontaneous and indicated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:792-796.
204. Whitehouse JS, Xu H, Shi Y. Mesenteric nitric oxide and superoxide production in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 2010;161:1-8
205. Kul M, Vurucu S, Demirkaya S. Enteral glutamine and/or arginine supplementation have favorable effects on oxidative stress parameters in neonatal rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:85-89.
206. Akisü M, Baka M, Çoker I, Kültürsay N, Hüseyinov A: Effect of dietary n-3 fatty acids on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in young mice: n-3 fatty acids alter platelet-activating factor and leucotriene B₄ production in the intestine. *Biol Neonate* 1998; 74: 31-38.
207. Hsueh W, Sun X, Rioja LN. The role of the complement system in shock and tissue injury induced by tumour necrosis factor and endotoxin. *Immunology* 1990;70:309-314.
208. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;116:960-964.

209. Travadi J, Patole S, Charles A. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 2006;60:185-189.
210. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:69-74
211. Seitz G, Warmann SW, Guglielmetti A. Protective effect of tumor necrosis factor α antibody on experimental necrotizing enterocolitis in the rat. *J Pediatr Surg* 2005;40:1440-1445.
212. Halpern MD, Clark JA, Saunders TA. Reduction of experimental necrotizing enterocolitis with anti-TNF alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:757-764.
213. Ren Y, Lin CL, Li Z, Chen XY, Huang X, Lui V, Nicholls J, Lan HY, Tam PK. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in infants with acute neonatal necrotizing enterocolitis. *Histopathology*. 2005;46(6):659-67.
214. Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6043-8.
215. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999;103:766-71.
216. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
217. Abreu MT, Vora P, Faure E. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167:1609-1616.
218. Melmed G, Thomas LS, Lee N. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170:1406-1415.

219. Naik S, Kelly EJ, Meijer L. Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:449-453.
220. Lotz M, Gutle d, Walther S. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cell. *J exp med* 2006;203:973-984.
221. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:517-528.
222. Szabo C, Pacher P, Swanson RA. Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:626-630.
223. Meyer-Ficca ML, Meyer RG. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:920-926.
224. Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species-relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide* 2006;14:169-179.
225. Hassa PO, Haenni SS. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:789-829.
226. Koltnur-Seetharam U, Dantzer F, McBurney MW. Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage *Cell Cycle* 2006;5:873-877.
227. Öztürk F: Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 143-148.
228. Afford S, Randhawa S: Apoptosis. *Mol Pathol* 2000; 53: 55-63.
229. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
230. Daeman ARC, Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs GAM, Clauss M, Vandenameele P, Buwman WA: Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104: 541-549.
231. Hill IE, MacManus JP, Rasquinha I, Tuor UI: DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 1995; 676: 398-403.
232. Itoh G, Tamura J, Suziki M, Suziki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K: DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the

- nick and labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1325-1331.
233. Fukuda K, Kojima M, Chiu JF: Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 1993; 142: 935-946.
234. Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY: Programmed cell death induced by ischemia reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1998; 274: G270-G276.
235. Kojima M, Iwakiri R, Yoshida T, Noda T, Utsumi H, Wu B, Okada K, Ootani A, Fujimoto K: Effect of Ischemia-reperfusion on apoptosis of small intestinal mucosa in the rat. *Oxidative Stress and Digestive Disease* 2001; 94-102.
236. Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, Kojima M, Utsumi H, Tsunada SH, Ootani A, Fujimoto K: Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 545-549
237. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian K: Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterology and Hepatology* 2000; 15: 109-120.
238. Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, Amemori S, Sakata H, Shimoda R, Oguzu T, Ootani A, Tsunada S, Fujimoto K: Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 139-145
239. Keunzler KA, Pearson PY, Marshall ZS: IL-11 pretreatment reduces cell death after intestinal ischemia-reperfusion. *J Surgical Research* 2002; 108: 268-272
240. Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sason SA: Identification of programmed cell death insitu via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501
241. Stefanutti G, Lister P, Smith VV. P-selectin expression, neutrophil infiltration, and histologic injury in neonates with necrotizing enterocolitis *J Pediatric Surgery* 2005;40:942-948

242. Musemeche C, Caplan M, Hsueh W, et al. Experimental necrotizing enterocolitis: the role of polymorphonuclear neutrophils. *J Pediatr Surg* 1991;26:1047- 9.
243. Elias JA. Homer RJ. Hamid Q. Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116: 497-500.
244. Funkhouser JD. Aronson NN Jr. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol*. 2007; 7: 96.
245. Hollak CE. van Weely S. van Oers MH. Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1288-1292.
246. Malaguarnera L. Musumeci M. Di Rosa M. Scuto A. Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*. 2005; 19: 128-132.
247. Van Eijk M. van Roomen CPI. Renkema GH. Bussink AP. Andrews L. Blommaert EF et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int. Immunol*. 2005; 17: 1505–1512.
248. Artieda M. Cenarro A. Ganan A. Jerico I. Gonzalvo C. Casado JM. et al. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1645-165.
249. Madazli R. Kucur M. Gezer A. Isman F. Bulut B. Chitotriosidase and YKL-40 in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008; 100: 239-243.
250. Ohkawa H, Ohosho N, Yago K: Assay fo lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
251. Şener G, Şatıroğlu H, Şehirli AÖ, Kaçmaz A: Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in rat model of thermal injury. *Life Sciences* 2003; 73: 81-91.
252. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotising enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;68:1227-1238.

253. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). *Pediatr Res* 2008;63:117-12.
254. Claud EC, Walker WA. Bacterial colonization, probiotics and necrotizing enterocolitis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:46-52.
255. Josef N, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Eng J Med* 2011;364:55-64
256. Carter BM. Treatment outcomes of necrotizing enterocolitis for preterm infants. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2007;36:377-384.
257. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:6-23.
258. Jennifer WL, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr* 2011;22:161-166.
259. Hansbrough F, Priebe CJ, Falterman KW. Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *Am j Surg* 1983;145:169-175.
260. Harrison MW, Connell RS, Campbell JR. Microcirculatory changes in gastrointestinal tract of the hypoxic puppy: an electron microscope study. *J Pediatr Surg* 1975;10:599-608.
261. Kliegman RM. Models of the necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;117:2-5.
262. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig dis Sci* 1997;42:878-884.
263. Saleri R, Giustina A, Tamanini C. Leptin stimulates growth hormone secretion via a direct pituitary effect combined with a decreased somatostatin tone in a median eminence-pituitary perfusion study. *Neuroendocrinology* 2004;79:221-228.
264. Canpolat FE, Yurdakök M, Özsoy Ş, Hazıroğlu R, Korkmaz A. Sıçan nekrotizan enteroklit modelinde rekombinant human granülosit koloni stimüle edici faktörün koruyucu etkileri. *Pediatr Surg Int* 2006;22:719-723.
265. Kumral A, Baskın H, Duman N, Yılmaz O, Tatlı M, Ozer E. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol Neonate* 2003;84:325-329.

266. Cadir F, Bıçakçı U, Tander B, Aydın B, Rızalar R, Arıtürk E. Protective effects of vitamin E and omeprazole on the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 809-813.
267. Balyemez G, Sivaslı E, Ceylan H, Tutar E, Ekiz Ş, Tarakçıoğlu M. Protective effects of Y- 27632 on hypoxia /reoxygenation-induced intestinal injury in newborn in newborn rats. *Journal of Pediatric Surgery* 2011; 46: 1490-1494.
268. Özdemir MAÖ, Ergin H, Yenisey Ç, Türk Şen N, Şimşek NG. Protective effects of clarithromycin in rats with hypoxia /reoxygenation induced intestinal injury. *Journal of Pediatric Surgery* 2010;45: 2169-2174.
269. Cintra AESU, Martins JL, Patricio FRS, Higa EMS, Montera EFS. Nitric Oxide Levels in the Intestines of Mice Submitted to Ischemia and Reperfusion: L-Arginine Effects Transplantation Proceeding 2008; 40: 830-83.
270. Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoğlu M.I, Haltaş H, Uysal S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2011;27:1179-1189.
271. Seitz G, Warmann WS, Guglielmetti A, Heitman H, Ruck P, Kreis EM. Protective effect of tumor necrosis factor alfa antibody on experimental necrotizing enterocolitis in the rat. *Journal of pediatric Surgery* 2005;40:1440-1445.
272. Ceylan H, Yüncü M, Gürel A, Gergerlioğlu HS, Bağcı C. Effects of Whole-Body Hypoxic Preconditioning on Hypoxia/Reoxygenation-Induced Intestinal Injury in Newborn Rats. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:325-332.
273. Öztürk H, Öztürk H, Duran H, Uzunlar A.K. Mibefradil, a T-Type Ca²⁺ channel blocker protects against mesenteric ischemia-reperfusion-induced oxidative injury and histologic alterations in intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci* 2006;51:1454-460.
274. Van't Wout JW, Linde I, Leijh PCJ, Van Fourth R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal condition and during acute inflammatory reaction. *Inflammation* 1989;13:1-14.
275. Gross M, Bürli R, Jones P, Garcia M, Batista B, Kazierman J. Pharmacology of novel heteroaromatic polycycle antibacterials. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3448-3457.

276. Bedos JP, Rieux V, Bauchet J, Muffat-Joly M, Carbon C. Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multiresistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a Mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:943-949.
277. Gerber AU, Craig A. Aminoglycoside-selected subpopulations of *Pseudomonas aureginosa*. *J Lab Clin Med* 1982;100:671-681.
278. Lumish RM, Norder CW. Therapy of neutropenic rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect dis* 1976;133:538-547.
279. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX. Neutropenia induced in outbred mice by simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:55 .
280. Cirioni O, Ghiselli R, Kamysz W, Orlando F, Silvestri C. Tachylesin III and granulocyte-colony stimulating factor enhance the efficacy of tazobactam/piperacillin in a neutropenic Mouse model of polymicrobial peritonitis .*Peptides* 2008;29:31-38.
281. Tansho S, Abe S, Ishibashi H. Efficacy of intravenous itraconazole against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *J Infect Chemother* 2006;12:355-362.
282. Ruiz-Cendoya M, Madrid H, Pastor J, Guarro J. Evaluation of antifungal therapy in neutropenic murine model of *Neoscytalidium dimidiatum* infection *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010;35:152-155.
283. Babaola C, Nightingale CH, Nicolau DP. Adjunctive efficacy of granulocyte colony-stimulating factor on treatment of *Pseudomonas aureginosa* pneumonia in neutropenic and non-neutropenic hosts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;53:1098-1100.
284. Panopoulos AD, Wataowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* 2008;42:277-288.
285. Colijn C, Foley C, Mackey MC. G-CSF treatment of canine cyclical neutropenia: A comprehensive mathematical model. *Experimental Hematology* 2007;35:898-907 .

286. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinc M, Karaman A, Gultek A. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999;34:1458-1462 .
287. Okur H, Kucukaydin M, Kose K, Kontas O, Doğam P, Kazez A. Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995;30:1416-1419.
288. Ozturk H, Dokucu AI, Ogun C, Buyukbayram H. Protective effects of recombinant human interleukin-10 on intestines of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rats. *J Pediatr Surg Res* 1996;66:131-137.
289. Squadrito F, Altavilla D, Ammendolia L, Squadrito G, Campo GM. Improved survival and reversal of endothelial dysfunction by the 21-aminosteroid, U-74389 G in splanchnic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Br J Pharmacol* 1995;115:395-400.
290. Sener G, Akgun U, Satiroglu H, Topaloglu U, Keyer-Uysal M. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15:19-22.
291. Sun Z, Olanders K, Lasson A, Dib M, Annborn M, Andersson K. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant a PAF inhibitör and monoclonal antibodies against the dhesion molecule PECAM-1. *J Surg Res* 2002;105:220-233.
292. Özkan KU, İnanç F, Kılınç M, Boran Ç. Leptin tedavisi yenidoğan rat incebarsağında hipoksi/reoksijenizasyon hasarına karşı koruyucu mudur? *Firat Tip Dergisi* 2005;10:5-9.
293. Ozen S, Akisu M, Baka M, Yalaz M, Sozmen EY, Berdeli A, Kultursay N. Insulin-like growth factor attenuates apoptosis and mucosal damage in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Biol Neonate* 2005;87:91-96.
294. Aydemir C, Dilli D, Uras N, Ulu HO, Oguz SS, Erdeve O. Total antioxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* 2011;46:2096-2100.
295. Morecroft JA, Spitz I, Hamilton PA, Holmes SJ. Plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor levels as predictors of disease severity and outcome in necrotising enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1994;29:798-800.

296. Lodha A, Asztalos E, Moore AM. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatrica* 2010;99:338-343.
297. Liu Y, Zhu L, Fatheree Y, Liu X, Pacheco SE. Changes in intestinal Toll-like receptors and cytokines precede histological injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:442-450.
298. Gribar SC, Sodhi CP, Richardson WM, Anand RJ, Gittes GK. Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. *The Journal of Immunology* 2009;182:636-646.
299. Richardson WM, Sodhi CP, Russo A, Siggers RH. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 inhibits Toll like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2010;139:904-917.
300. Sodhi CP, Sh XH, Richardson WM, Grant ZS. Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology* 2010;138:185-196.
301. Quereshi FG, Leaphart C, Cetin S, Li J, Grishin A, Watkins S. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution *Gastroenterology* 2005;128:1012-1022
302. Wolfs TG, Derikx JP, Hodin CM, Vanderlocht J, Driessen A. Localization of the lipopolysaccharide recognition complex in the human healthy and inflamed premature and adult gut. *Inflamm Bowel dis* 2010;16:68-75.
303. Giannone PJ, Alcamo AA, Schanbacher BL, Nankervis CA, Besner GE, Bauer JA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: A novel therapeutic target in necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research* 2011;70:67-71.

Deneysel Fare Modelinde Nötrofil Düzeyinin Nekrotizan Enterokolit Gelişimi Üzerine Etkisi

Özet

Giriş: Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanlarda ortaya çıkan en sık gastrointestinal cerrahi acildir. Özellikle prematüre bebeklerde morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerindedir. Son yıllarda yenidoğan yoğun bakım birimlerinin gelişmesi ve prematüre bebeklerin daha uzun süre yaşatılabilmesi nedeniyle NEK sıklığı artış göstermiştir. Nekrotizan enterokolitin patofizyolojisinde multifaktöriyel mekanizmalar rol oynamaktadır. En önemli risk faktörünün prematürite olduğu bilinmektedir. Herhangi bir nedenle oluşan hipoksi reoksijenasyon (H/R) sürecinde yoğun olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri bağırsak dokusundaki hasardan sorumlu temel faktördür. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu yanı sıra nötrofillerin aktivasyonunu yaratarak da bağırsak hasarı oluşturabilirler. Bu radikaller olayın meydana geldiği organda toksik etki göstererek doku hasarı ve apoptozise neden olur.

Amaç: Bu çalışmanın hipotezi nötrofillerin fazla olduğu ve aktif olduğu ortamda ortaya çıkan mediatörlerin nekrotizan enterokolit gelişimini kolaylaştırdığıdır. H/R ile oluşturulan deneysel nekrotizan enterokolit modelinde nötrofil sayısının, nötrofillerden salınan mediatörlerin, G-CSF tedavisinin nekrotizan enterokolit gelişimine katkısının belirlenmesi, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), poli(ADP-riboz)polimeraz (PARP) ve toll like reseptör (TLR4) ve IL-6 düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yaşamın 15.-20. gününde 10-20 g fare yavruları 5 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol grubu; Grup 2 klasik doz (10 mcg/kg) Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) uygulanan grup; Grup 3 yüksek doz G-CSF (100 mcg/kg) uygulanan grup; Grup 4: nötropenik (siklofosamid uygulanan) grup; Grup 5 tedavisiz NEK grubu olarak belirlendi. Çalışmanın 5. gününde yavru farelere hipoksi için %100 karbondioksit 5 dakika ve ardından %100 oksijen 10 dakika süre ile uygulandı. Bağırsak dokusu homojenatında TBARS, myeloperoksidaz (MPO), kitotriozidaz, IL-6, PARP, TLR4 çalışıldı. Histolojik inceleme için hazırlanan preparatlarda hasar skorlaması ve apoptoz değerlendirildi.

Bulgular: Yüksek doz G-CSF uygulan, nötrofil sayısının yüksek olduğu Grup 3'de hasar skoru diğer gruplardan yüksek saptandı. TUNEL yöntemi ile değerlendirilen apoptotik hücre sayısı da Grup 3'de en fazla olarak saptandı. TBARS tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı artmıştı. MPO ve kitotriozidaz aktivitesi en yüksek olarak Grup 3'de saptandı. Kontrol grubu ile Grup 4 arasında MPO ve kitotriozidaz aktivitesi açısından anlamlı fark saptanmadı. TLR4, IL-6, PARP düzeyleri de Grup 3'de diğer gruplara ve kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı.

Sonuç: Nötrofiller NEK patogenezinde hasardan sorumlu önemli bir faktördür. Nötropeni hasarın artışını önlemek için koruyucu bir mekanizma olabilir. Klinikte nötropeni nedeniyle riskli prematüre bebeklere G-CSF uygulamak NEK için bir risk faktörü olabilir. Kitotriozidaz ve PARP düzeyleri NEK için belirteç olarak kullanılabilir. Ancak tüm bunların desteklenmesi için klinik çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Nekrotizan enterokolit, nötropeni, PARP, kitotriozidaz

İNGİLİZCE ÖZET

The Effect of Neutrophil Level on the Development of Experimental Necrotizing Enterocolitis Model in the Mouse

Abstract

Bacgrund: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common gastrointestinal surgical emergency. It is an important part of morbidity and mortality in premature infants. In recent years the frequency of NEC is increased because of the better care in Newborn Intensive Care Units and the longer life times achieved in premature infants. The pathophysiology of NEC includes multifactorial mechanisms. The most important risk factor is prematurity. The hypoxia and reoxygenation (H/R) process which occurs by any reason produces free oxygen radicals and these products are mainly responsible for the damage in the intestinal tissue. Free oxygen radicals produces intestinal damage by lipid peroxidation besides neutropil activation. These radicals produce their toxic effects in the organ that the process takes place by tissue damage and apoptosis.

Objective: The mediators that arise in the milieu of activated and high number of neutrophils facilitates the development of NEC is the hypothesis of this study. The aim of the study is to determine the contribution of neutropil number and the mediators released by neutrophils, the G-CSF treatment in the development of NEC as well as determination of TBARS, PARP, TLR4 and IL-6 levels in an experimental model of NEC made out by H/R.

Material and Metods: Young mice of 10-20 g at the 15-20th day divided into 5 groups: Group 1 control group; Group 2 administration of classical dose (10 mcg/kg) G-CSF; Group 3, administration of high-dose (100 mcg/kg) G-CSF; Group 4, neutropenic group; Group 5, NEC without treatment. In the fifth day of study young mice were given 100% carbondioxide for five minutes for hypoxia and ensuing 100% oxygen for 10 minutes. TBARS, MPO, chitotriosidase, IL-6, PARP and TLR4 levels were measured in tissue homogenates. Apoptosis and tissue damage scores are evaluated in sections prepared for histological examination.

Results: In Group 3 which was administered high-dose G-CSF with high neutrophil numbers the damage score was higher than other Groups. The number of apoptotic cells which are determined by TUNEL method in Group 3 is also higher than the

other groups. TBARS is increased in all other groups compared to control group. The highest MPO and chitotriosidase activity is found in Group 3. MPO and chitotriosidase activity is not significantly different between control and Group 4. TLR4, IL-6 and PARP levels were higher in Group 3 compared to other and control groups.

Conclusion: Neutrophils are important in the pathogenesis of tissue damage in NEC. Neutropenia may be a protective mechanism. The administration of G-CSF in premature infants with neutropenia may be a risk factor for NEC. PARP and chitotriosidase levels may be used as markers for NEC. Clinical studies are required to support these findings.

Key words: Necrotising enterocolitis, neutropenia, PARP, chitotriosidase

EKLER

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2011-0034
KONU: Onay

31/03/2011

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “DENEYSEL FARE MODELİNDE NÖTROPİL DÜZEYİNİN NEKROTİZAN ENTEROKOLİT GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: : Prof. Dr. Mete AKİSU, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Uzm. Dr. Demet TEREK Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi
Prof. Dr. Meral BAKA, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Eser SÖZMEN, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Doç. Dr. Mehmet YALAZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Uzm. Dr. Özge ALTUN KÖROĞLU, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Uzm. Dr. Betül SİYAH BİLGİN, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. Nilgün KÜLTÜRSAY, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumunuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ *Katılmadı*
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Süleyman AKKAN *Katılmadı*

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL *Hüseyin Tezel*

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN *İsmet Deliloğlu*

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK *Lokman Öztürk*

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL *Katılmadı*

Doç. Dr. Tansel TANRIKUL *Tansel Tanrikul*

Doç. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU *N. Ülkü Karabay Yavaşoğlu*

Yrd. Doç. Dr. Gülnur SEVİN *Gülnur Sevin*

Özcan NALBANTOĞLU *Özcan Nalbantoğlu*

Tingiz ÖZCAN *Tingiz Özcan*