

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE İNTRAABDOMİNAL
KARBONDİOKSİT ENSÜFLASYONUNUN BARSAK ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ŞENOL EMRE**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GONCA TOPUZLU TEKANT**

İSTANBUL-2006

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca gösterdikleri yakın ilgi, emek ve özveriden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Daver Yeker, Prof. Dr. Nur Danişmend, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Cenk Büyükkunal, Prof. Dr. Osman Faruk Şenyüz, Prof. Dr. Yunus Söylet, Prof. Dr. Ergun Erdoğan, Prof. Dr. Nüvit Sarımurat, Prof. Dr. Sinan Celayir ve Doç. Dr. Haluk Emir'e, ağabeylerim Op. Dr. Mehmet Eliçevik , Op. Dr. Zekeriya İlçe ve Uz. Dr. Mefkür Bakan'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamıza verdikleri emek, destek ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Dildar Konukoğlu, Prof. Dr. Sergülen Dervişoğlu, Prof. Dr. Tuncay Altuğ, Uz. Dr. Günay Can, Dr. Sinem Fırtına , Tıb. Bio. Çetin Karaca, Dr. Bilge Can ve İnt. Dr. Sinan Aslan'a sonsuz teşekkür ederim.

Beraber çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım ve ağabeylerime, kliniğimizin değerli hemşire ve çalışanlarına içten teşekkürlerimi sunarım. Yardım ve sevgilerini hiçbir zaman unutmayacağım.

Tezimin fikren oluşmasını sağlayan, çalışma boyunca sürekli destek veren ve yol gösteren, güleryüzlü tez hocam Doç. Dr. Gonca Topuzlu Tekant'a ayrıca teşekkür etmek isterim.

Her zaman yanımda olan sevgili ailem, dostlarım ve Sinem'e gösterdikleri sevgi, sabır ve anlayıştan dolayı minnet borçluyum.

Dr. Şenol Emre

KISALTMALAR

NEK : Nekrotizan Enterokolit

PAF : Trombosit aktive edici faktör (Platelet activating factor)

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentaz

iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz

nNOS : Nöronal nitrik oksit sentaz

GSH : Glutasyon

TBARS: Tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler (Thiobarbituric acid reactive substances)

TNF- α : Tümör nekroz edici faktör alfa

IL : İnterlökin

Ig : İmmunglobülin

K : Kontrol grubu

N : Nekrotizan enterokolit grubu

P : Pnömoperitoneum grubu

NP : Pnömoperitoneum yapılan nekrotizan enterokolit grubu

EGF : Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)

DİK : Yaygın damariçi pıhtılaşma (Disseminated intravascular coagulopathy)

CRP : C- reaktif protein

ADKG : Ayakta direkt karın grafisi

CO₂ : Karbondioksit

O₂ : Oksijen

M : Molar

KCL : Potasyum Klorür

Nm : Nanometre

w/v : Ağırlık / hacim

MDA : Malondialdehit

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	2
KISALTMALAR.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT.....	6
2.1.1. Tarihçe.....	6
2.1.2. Sıklık.....	6
2.1.3. Etyoloji ve Patogenez.....	7
2.1.4. Patoloji.....	12
2.1.5. Tanı ve Evreleme.....	13
2.1.6. Tedavi.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNİN OLUŞTURULMASI.....	20
3.2. İNTRAABDOMİNAL CO ₂ İNSUFLASYONU.....	21
3.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	21
3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	22
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	23
4. BULGULAR.....	27
4.1. TBARS SONUÇLARI.....	27
4.2. NO SONUÇLARI.....	29
4.3. GSH SONUÇLARI.....	31
4.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	33
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇLAR.....	40
7. ÖZET.....	41
8. SUMMARY.....	42
9. KAYNAKLAR.....	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanlarda karşılaşılan en sık gastrointestinal sistem acilidir (1). Klasik olarak NEK, prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olarak bilinir. Bu nedenle son kırk yılda yenidoğan yoğun bakım koşullarındaki teknolojik ilerleme ve deneyim artışı nedeniyle 1000 gram ve altındaki bebeklerin dahi yaşatılabilir hale gelmesi sonucunda NEK sıklığında artış yaşanmıştır (2, 3).

Tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte iskemik hasara uğramış bir barsak zemininde geliştiği düşünülen NEK'te, bebeklerin sıklıkla zamanından önce doğmuş ya da düşük doğum ağırlıklı, bağışıklık sistemleri yeterince gelişmemiş yenidoğanlar olması nedeniyle, uygulanacak tedavi konusu halen tartışmalıdır. Genellikle mümkün olduğunca az girişimsel yöntemlerle ve az barsak kaybı ile hastanın içinde bulunduğu durumdan kurtarılıp aşamalı olarak tedavi edilmesi güncel tedavinin esasını oluşturmaktadır (1). Bu nedenle bir çok cerrahi tedavi yöntemi tanımlanmıştır. Ancak özellikle son yıllarda cerrahinin hemen her alanında etkin olarak kullanılan bir tanı ve tedavi yöntemi olan laparoskopik cerrahinin NEK'te kullanımı ile ilgili çok az sayıda klinik deneyim ve yayın bulunmaktadır (4,5). Öte yandan laparoskopik cerrahide uygulanan pnömoperitoneumun barsak üzerine etkileri konusunda deneysel ve klinik birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda fizyolojik sınırlar içinde laparoskopi uygulanan deneklerde gastrointestinal sistem üzerinde laparoskopinin olumsuz yan etkileri izlenmediği bildirilmiştir (6). Ancak İngilizce literatürde taradığımız çalışmalarda, deneysel NEK modelinde laparoskopinin gastrointestinal sistem üzerine etkileri konusunda bir yayına rastlayamadık. Bu çalışma, NEK'li yenidoğan bebeklerde güvenle uygulanabilirliği bildirilen laparoskopinin, gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini irdelemek amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

2.1.1. Tarihçe:

Tarihte gerçek anlamda ilk NEK olgusunu 1888’te Paltauf’un bildirdiği kabul edilir. Paltauf, ikisi doğum sonrası ilk 15 saatte, diğer üçü ilk 2 gün içinde ölen beş olguluk yenidoğan serisinin ortak özelliğinin kolon ve ince barsaklarda çok sayıda perforasyon ve buna bağlı gelişen peritonit olduğunu bildirmiştir. Yine bu olguların tümünde barsaktaki nekrozun oldukça geniş bir ince barsak segmentini tutmuş olduğunu belirtmiştir (7). İlk başarılı tedavi ise 1943’te Agerty ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. 1953’e kadar “enfeksiyöz enterit” olarak tanımlanan NEK’e bugünkü adını ilk veren Schmid ve Quasier olmuştur (2, 7). 1964’de Berdon ve arkadaşları yayınladıkları 21 olguluk seride NEK’in klinik ve radyolojik ve özellikleri ile tedavi sonuçlarını yayınlamışlardır. Bu bildirideki belki de en önemli nokta 1954-1964 yıllarını içeren olgu serisindeki 21 olgudan 13’ünün 1963 yılının 6 aylık dönemine ait olmasıdır (7). Gerçekten de 1960 öncesi yıllarda literatürde nekrotizan olgularına pek rastlanmazken yenidoğan yoğun bakım koşullarındaki düzelmeye birlikte zamanından önce doğmuş veya düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların da yaşatılabilmesi sonucunda bildirilen NEK olgularında da belirgin artış olmuştur (2). 1974 ve 1975’te Barlow ve Santulli’nin yaptığı deneysel ve klinik çalışmalar NEK’in patogeneze yönelik çok değerli bulgular ortaya çıkarmıştır (8, 9). Özellikle Santulli ve arkadaşları 1975’de 64 olguluk NEK serisinin değerlendirilmesi sonucunda intestinal mukoza hasarı, bakteri ve beslenme (mama) hastalığının meydana gelmesine neden olan 3 ana faktör olduğunu belirtmişlerdir (9). 1960’lı yıllarda hastalığın erken dönemde cerrahi müdahale ile tedavi edilebileceği düşünülürken, 1970’li yıllarda erken tanı konursa cerrahi dışı yöntemlerle de hastalığın tedavi edilebileceği ortaya konmuştur (7). 1978’de Bell ve arkadaşları NEK’in klinik evrelemesini yayınlamış, 1986’da Walsh ve Kliegman da bu sınıflamayı yeniden düzenlemiştir (10, 11).

2.1.2 Sıklık:

NEK yenidoğanlarda karşılaşılan en sık ve en ciddi gastrointestinal sistem hastalığıdır (1). Amerika Birleşik Devletleri’nde NEK sıklığı her 1000 canlı doğumda 3, düşük doğum ağırlıklı bebeklerde bu oran 30/1000, doğum ağırlığı 1500 gramın altındaki bebeklerde yaklaşık %10, yoğun bakım ünitelerine yatan yenidoğanlarda ise

%0.8-8'dir (1, 2, 12). Ülkemizde ise çok fazla sayıda araştırma olmamakla birlikte genel sıklık %0.19-7,2 prematüre yenidoğanlarda ise %7,2-8,2 olarak bildirilmiştir (13, 14). NEK'li bebeklerin %90'dan fazlası 2000 gramdan daha düşük ağırlıktadır. %48-58'i ise 1500 gramdan daha düşük ağırlıktadır. Miadında doğan bebekler tüm NEK olgularının %7-13'ünü oluşturur. Ortalama gestasyonel yaş 30-32 haftadır (2). Kentsel bölgelerde kırsal kesime göre 1,5 kat daha sık görülür (15).

Klinik bulgular genellikle yaşamın ilk 10 günü içinde ortaya çıkar (2). Ancak zamanından önce doğmuş bebeklerde semptomlar zamanında doğmuş bebeklere göre daha geç ortaya çıkar (16). Şöyle ki ; semptomların ortaya çıkış zamanı 30. haftadan daha erken doğmuş bebeklerde ortalama 3 hafta, 31-33. haftalar arasında doğanlarda ortalama 2 hafta, 34. haftadan sonra doğanlarda 5 gün ve miadında doğmuş bebeklerde ise 2 gündür. Hastalık ne kadar erken ortaya çıkarsa komplikasyonları ve ölüm oranı da o kadar artar (17). Hastalığın mortalitesi %25-30'dur. Bu oran 1000 gramın altındaki ve 28. haftadan daha erken doğan bebeklerde %50'lere varır (18).

2.1.3 Etyoloji ve Patogenez:

Birçok deneysel ve klinik çalışmaya karşın NEK'in etyolojisi tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Ancak etyolojide prematürite, formula mama ile beslenme, bazı enfeksiyon ajanları, barsak iskemisi, hipoksi ve barsak motilite bozukluğunun etkili olduğu düşünülmektedir (1, 2, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22). Ancak klasik olarak enfeksiyon, beslenme ve iskeminin NEK patogenezinde en önemli 3 faktör olduğuna inanılır (23).

2.1.3.1 Prematürite:

Epidemiyolojik çalışmalar prematürite ile NEK arasında sıkı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Buna neden olarak ise barsağın işlevsel ve yapısal olarak gerekli olgunluğa ulaşamaması gösterilmiştir (24). Gerçekten de prematüre bebeklerin gastrik asit ve pepsin üretimi düşüktür ve amilolitik, lipolitik ve proteolitik salgıları yeterli düzeyde değildir. Yutularak alınan mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma sistemi olan gastrik asit ve pepsin miktarları ancak 1. ay civarında erişkin düzeyine gelir. Mide asidinin düşük düzeyde olması lümen içinde pH'ın yükselmesine neden olur ve sonuçta bakteriyel kolonizasyon için daha uygun bir ortam oluşur (25). Ayrıca yaşamın erken dönemlerinde barsak, sindirilmemiş proteinlere karşı daha geçirgendir. Bunun sebebi olarak mikrovillüs membranındaki geçirgenliğin yüksek olması

gösterilmiştir. Buna yol açan etkenlerin ise; müsin içeriğinin yetersiz ve içerdiği lipid/protein oranının normalden yüksek olması olabileceği düşünülmüştür (26). Bu da erken dönemde beslenmeyle alınan bakteri ve toksinlerin hidrolize edilememesiyle sonuçlanır.

Yenidoğan barsağında erken dönemde salgısal IgA düzeyi ve T lenfosit sayısı daha düşüktür. Bu da bakteriyel invazyonu kolaylaştıran başka bir faktördür (24). Yine daha önceki çalışmalarda diğer bir faktör olarak NEK'li yenidoğan ve prematürelerde barsak mukozasındaki Paneth hücrelerinin lizozim içeriğinin azaldığı gösterilmiştir (27). Bu da bakteriyel canlılık, yapışma ve translokasyonun kolaylaşması ile sonuçlanır.

2.1.3.2 İskemi:

Olgunlaşmamış barsak bariyeri mezenterik akımdaki azalmadan ciddi şekilde etkilenir. 1969 yılında Lloyd tarafından tarif edilen "*diving refleksi*" (dalma refleksi) teorisine göre hipoksik durumlarda kan, yaşamsal açıdan öncelikli organların korunması için kalp, beyin ve böbreklere yönlendirilir. Bu da periferik organlar ve sindirim sistemine giden kan miktarında azalma ile sonuçlanır. İskemi süresi uzarsa oluşan hasar geri dönüşümsüz hale gelir (28). Bu teoriye dayanan birçok deneysel model geliştirilmiştir (9, 19, 20). Perinatal asfiksi, yenidoğan hyalen membran hastalığı, hipotansiyon, şok, persistan duktus arteriyosus ve hipotermi mezenterik kan dolaşımını bozarak NEK'e sebep olabilir (29, 30, 31). Umbilikal arter kateterizasyonları, yenidoğan polisitemileri, exchange transfüzyonlar sonrasında vazospazm ya da mikrovasküler düzeyde tromboembolik olaylar nedeniyle NEK gelişebildiği bildirilmiştir (32, 33, 34).

Splanknik sahanın kan akımının düzenlenmesinde sempatik sinir sistemi ve humoral mekanizmalar rol oynar. NEK oluşumuna yönelik bu iki mekanizmaya dayanan teoriler üretilmiştir. NEK oluşumunda metabolik faktörlerin etkin olduğunu öne süren metabolik teoriye göre doku kanlanması düzenlenmesi; dokuya gelen kan miktarıyla değil dokuya gelen oksijen miktarıyla ilgilidir ve bölgesel olarak düzenlenir. Diğer teori olan myojenik refleks teorisine göre ise doku kanlanması, dokudaki vasküler düz kas hücrelerinin gerilme basıncı ile düzenlenir. Şöyle ki damariçi alandaki basınç artışı, transmural basınç artışına, bu da barsaktaki damar düz kas hücresinin kasılmasına ve vazokonstrüksiyona neden olmaktadır (35). Ayrıca yenidoğan barsağının iskemiye karşı olan myojenik vasküler yanıtı erişkine göre çok daha hassas ve değişkendir (36). Düşük mezenter kan akımı ve sonrasındaki reperfüzyon sonucunda ksantin oksidaz,

hipoksantin ve moleküler oksijen arasındaki bir reaksiyonun ürünü olarak toksik süperoksid radikali gelişir. Oksijen radikalleri hücre yapılarına çok toksiktir. Hücre zarını ve hücre içi organellerin (lizozom, mitokondri) membranlarını parçalar. Böylece barsak mukoza hücrelerinin geçirgenliği artar ve barsak bariyeri bozulur (2).

2.1.3.4 Enfeksiyon Ajanları

Normal koşullarda bir yenidoğanda sindirim sistemi florası 10. günde oluşumunu tamamlar (37). Prematürelerde daha belirgin olmak üzere yenidoğanlarda bağışıklık sisteminin zayıflığı, barsaktaki IgA düzeyinin ve mide asit salgısının az olması bakteriyel kolonizasyonun hızlı ve düzensiz bir şekilde gelişmesine neden olur (38). Barsakta spesifik ve nonspesifik olmak üzere iki tip savunma sistemi vardır. Mide asidi, pepsin düzeyi, pankreatik enzimler, barsak motilitesi ve mukus sindirim sistemi bariyerinin nonspesifik elemanlarıdır. B ve T lenfositler ile immunglobulinler ise spesifik elemanlarıdır. Tüm bu savunma sistemlerinin yenidoğan ve prematürelerde gelişmemiş olması bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştırıcı etkenlerdir (2). Bunun yanı sıra salgısal IgA, IgM ve barsakla ilişkili IgG'nin kaynağı olan anne sütü ile beslenmeme durumunda barsağın spesifik savunma mekanizması bozulur. Anne sütü ile beslenmeme aynı zamanda vücut savunması için gerekli diğer önemli bileşenler olan immun hücreler, lizozim, epidermal büyüme faktörü (EGF), oligosakkaridler ve laktoferrinin alınamamasına; dolayısıyla bağışıklık sisteminde zayıflığa neden olur (7).

NEK, klasik olarak yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki ilerlemeler ile sıklığı artan bir hastalıktır. Lawrence ve arkadaşları bunun nispeten antiseptik bir ortam olan yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde atipik bir bakteriyel flora oluşması, hem yoğun antibiyotik kullanımı hem de olgunlaşmamış barsak savunma sistemi dolayısıyla oluştuğunu bildirmiştir (39). Bugüne kadar NEK gelişimi ile doğrudan ilişkisi ispatlanmış bir enfeksiyon ajanı gösterilememiştir. Sıklıkla ortaya konan mikroorganizmalar olgunlaşmamış yenidoğan barsağındaki flora elemanlarıdır. 1999'da Peter ve arkadaşları tarafından yayınlanmış olan prospektif çalışmada NEK gelişimi ile doğrudan ilişkilendirilebilecek bir mikroorganizma saptanmadığı bildirilmiştir (40). Ancak NEK'li hastaların kan, dışkı ve BOS kültürlerinde Klebsiella ve E.coli daha sık görülmektedir. S. Epidermidis, S. Aureus, Proteus, Clostridia, Salmonella ve Enterobacter suşları da izole edilen mikroorganizmalardandır (2).

2.1.3.5 Beslenme:

Enteral beslenme NEK gelişiminde önemli bir role sahiptir. Özellikle düşük doğum ağırlıklı ve prematüre yenidoğanlarda erken, günlük miktarı hızla artırarak ve fazla hacimle beslemenin NEK oluşumunu artırdığı bilinmektedir (41). Ayrıca hiperosmolar formula mamalar ile beslemenin de NEK sıklığını artırdığı gösterilmiştir. Gerçekten de NEK'li bebeklerin %90-99'u ticari mamalarla beslenen bebeklerdir. Bu mamalar bakteriyel çoğalma için bir substrat görevi görür. (2). Gastrointestinal sisteme hiperosmolar solüsyonların verilmesi, mukozada hasara neden olur ve NEK gelişimine katkıda bulunur. Hiperosmolar besinin lümen içine aşırı su çekerek serum osmolaritesini yükselttiği ve kardiyovasküler sistemde dolaşan volümün azalmasına neden olarak hiperviskoziteye yol açtığı, bunun da barsak dolaşımını bozduğu iddia edilmiştir (2, 7). Ayrıca hiperosmolar maddelerin barsak mukozası üzerinde doğrudan etkili olduğu da düşünülmektedir (2). Buna karşılık anne sütü ile beslenmenin NEK için doğrudan koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir. Anne sütünde bulunan IgA, IgG , IgM, laktoferrin, lizozim, transferin, vitamin E, beta karoten, asetil hidrolaz, makrofaj ve lenfositler sayesinde anne sütünün bebeğin bağışıklık sistemini güçlendirerek NEK'ten koruduğu düşünülmektedir (8, 42, 43).

2.1.3.6 İlaçlar:

NEK oluşumunda etkili olabilecek birçok ilaç ve madde vardır. Örneğin prematürelerde retinopati profilaksisinde kullanılan oral vitamin E ve mekonyum ileusu tedavisinde kullanılan hiperosmolar kontrast maddeler ile oluşmuş NEK olguları bildirilmiştir (44, 45). Patent duktus arteriyosus kapanmasını hızlandırmada kullanılan indometazin, prostaglandin sentetazı bloke ederek vazokonstrüksiyona neden olan bir ajandır ve mezenterik kan akımını azaltarak prematürelerde NEK'e yol açabileceği bildirilmiştir (46, 47, 48). Yine prematürelerde apne tedavisinde kullanılan metilksantin türevleri olan aminofilin ve teofilin barsak hareketlerini yavaşlatıp toksik radikaller oluşturarak eritrosit hasarına ve bakteriyel kolonizasyona yol açar (49). Gebelik döneminde kokain kullanan anne bebeklerinde de vazokonstrüktif etkiye bağlı NEK olduğu bildirilmiştir (50, 51, 52).

2.1.3.7. İnflamatuvar yanıt hücreleri ve sitokinler:

Sitokinler nötrofil kemotaksisi, IgA salınımını artırma, epitel hücre çoğalması, farklılaşması ve mukozal hasarların onarımında rol oynar (43). Son yıllarda bazı sitokinlerin NEK gelişiminde etkin rol oynadıkları belirtilmiştir. Özellikle trombosit aktive edici faktör (PAF), NEK patogeneğinde etkin bir rol oynamaktadır. (53, 54, 55, 56) . PAF; endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler ve E.Coli tarafından üretilen bir sitokindir. İntravenöz uygulamada sistemik hipotansiyon, hemokonsantrasyon, nötropeni ve barsak nekrozuna yol açabilir (57).

Bakteriyel hücre duvar ürünlerine endotoksin denir. Lipopolisakkarit yapıdaki endotoksinler kapiller geçirgenlikte artışa, nötrofil agregasyonuna, trombosit agregasyonuna, endotelyal hücre membranında ve mikrovasküler yapıda direkt etkiyle hasara neden olur. Endotoksinler PAF üretimini artırmakla birlikte, PAF ve endotoksinler sinerjistik etkiye sahiptir. İkisi de sistemik etkileri yanında barsak nekrozuna yol açabilir. PAF antagonistleri, PAF ve endotoksinin zararlı etkilerini önler (58). PAF'ın antagonisti plazma asetil hidrolaz enzimidir. Plazma asetil hidrolaz, PAF'ın yarı ömrünü birkaç dakikaya indiren bir enzimdir. Normal düzeyine yaşamın 6. haftasında ulaşmaktadır. Tüm bebeklerde düşük olmakla birlikte NEK'li bebeklerde bu azlık daha da belirgindir (58, 59). Plazma asetil hidrolaz anne sütünde mevcuttur ve anne sütünün NEK'i önleyici özelliklerinden biri de bu olabilir (60). Yapılan deneysel çalışmalarla PAF'ın yanı sıra tümör nekroz faktörü alfa (TNF α), IL-6 ve IL-8'in de NEK gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (43, 58). Özellikle TNF α , PAF ile benzer özellikler gösterir. Endotoksin ilişkili şok ve bilhassa barsakta doku hasarına yol açmaktadır (58). Aynı şekilde endotel kaynaklı gevşeme faktörü ya da nitrik oksid (NO) de yenidoğan ve erişkinlerde septik şok gelişimi ile ilişkilidir (61). NO sentaz (NOS) ın katalizlediği Arginin in Sitrüline dönüşme tepkimesinin ürünü olan NO, PAF'ın mikrodolaşım üzerindeki vazokonstrüktif ve trombojenik etkilerini ortadan kaldırır. NO üretimi NOS'un üç izoformu tarafından düzenlenir. NOS1 (nöronal NOS-nNOS) ve NOS3 (endotelyal NOS-eNOS) kalsiyuma bağlı olarak düşük miktarlarda üretilir; picomol düzeyinde NO üretirler. Bunun aksine, NOS2 (indüklenebilir NOS-iNOS), çoğunlukla ortamda bulunmaz, fakat inflamatuvar sitokinlerle uyarılırsa makromolar miktarlarda NO üretimine neden olur. Bu üç izoform da gastrointestinal sistem boyunca mevcuttur. NO üretimi vazodilatör ve antitrombotik etkiyle barsağın mikrodolaşımını artırır. Proinflamatuvar sitokinler ile üretimi artan NOS2, dolaşımdaki NO miktarını güçlü bir

şekilde artırır. Yarı ömrü 3-5 saniye olan NO hızla metabolize olarak dokularda toksik etkili olan serbest oksijen radikali peroksinitrit iyonlarını oluşturur. Bu iyon demirin sülfidril grubuna bağlanarak elektron transport zincirini bozar ve hücre ölümüne neden olur (62, 63).

Glutasyon (GSH) vücudun en önemli antioksidan intrasellüler moleküllerinden biridir. Suda çözünen bir tripeptiddir (64, 65). Glutasyon pekçok serbest oksijen radikalini detoksifiye eder. Bununla birlikte peroksinitritin de üretimini azaltarak oksidasyon-redüksiyon dengesinin sağlanmasında önemli rol üstlenir. Glutasyon düzeyindeki göreceli düşüklük serbest oksijen radikallerinin artmasına ve bunlar aracılığıyla oluşan doku hasarına neden olur (65). İntestinal iskemi ve reperfüzyonun barsaktaki glutasyon düzeyinde belirgin azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (66). Yine prematür yenidoğanlarda kan glutasyon düzeyleri düşük bulunmuştur. Ancak bununla birlikte cerrahi müdahale gerektiren NEK'li bebeklerde kan glutasyon düzeyinin yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada NEK'in derecesiyle glutasyon düzeyleri arasında da korelasyon saptanmıştır (65).

2.1.4. Patoloji :

NEK, yenidoğanlarda barsağın bir veya birden çok bölümünü ya da tamamını tutabilen, en sık koagülasyon nekrozu ve inflamasyonla karakterize bir hastalıktır. En sık ileum (%86), daha sonra kolon (%74), daha az olarak da jejunum(%28) tutulur. Olguların %44'ünde hem ince barsaklar hem kolon tutulur (2, 67). Barsağın %75'inden fazlasının tutulduğu NEK tablosu ise "PAN-NEK", "fulminan NEK" ya da "NEC-totalis" olarak isimlendirilir. NEK'te perforasyonlar barsağın daha ziyade antimezenterik yüzünde ve çoğunlukla terminal ileumda olur (2). Makroskopik olarak barsak şiş ve ödemli görünür. Serozal yüzey, fibröz eksuda nedeniyle kırmızı-gri ya da gangren oluşmuşsa siyah renktedir. Mikroskopik olarak ise en sık koagülasyon nekrozu ve inflamasyon, daha az olarak da ülserasyon, hemoraji ve pnömotozis intestinalis görülür (67, 68). NEK perforasyona kadar ilerlemezse 3. günden sonra hızlı bir epitelizasyonla iyileşmeye başlar. Fibroblastik proliferasyon 8.-9. günde belirginleşir. İyileşme sırasında darlık ortaya çıkabilir (2).

2.1.5. Tanı ve Evreleme

2.1.5.1. Klinik Bulgular:

Başlangıçta sepsisemiye benzer letarji, hipotermi veya hipertermi, apne, bradikardi ve hipoglisemi gibi bulgular ortaya çıkar (2, 69). Klasik 3 bulgu ise karında distansiyon, mide içeriği retansiyonu ve rektal kanamadır. NEK'te görülen gastrointestinal ve sistemik bulgular Tablo-1'de özetlenmiştir(69).

Tablo-1: NEK'teki klinik bulgular.

Gastrointestinal Bulgular	Sistemik Bulgular
Karın çevresinde artma	Letarji
Karında hassasiyet	Vücut ısısında düzensizlik
Beslenme intoleransı	Apne – Solunum düzensizlikleri
Mide boşalımında gecikme	Metabolik asidoz
Gaitada gizli/bariz kan	Hipo/hiperglisemi
Diyare	Periferik dolaşımda bozulma
Karında kitle	Yaygın damariçi pıhtılaşma (DİK)
Karın duvarında ödem ve eritem	Dolaşım kollapsı

2.1.5.2. Laboratuvar Bulguları:

NEK düşünülen bir bebekte yapılması gereken ilk laboratuvar tetkikleri: tam kan sayımı, periferik yayma, C reaktif protein (CRP), kan gazı, gaitada gizli kan, plazma elektrolitlerinin kontrolü, ayakta direkt karın grafisi (ADKG) ve abdominal ultrasonografidir (2, 7). Kan tablosunda sıklıkla nötropeni, bazen lökositoz, trombositopeni, hiponatremi ve metabolik asidoz görülebilir. Trombositopeni hemen tüm hastalarda saptanır. Bu, genellikle gram negatif sepsisin bir belirticidir ve ilerlemiş hastalığı gösterir (7). Trombositopeni, NEK veya barsaklardaki dolaşım bozukluğuyla ilgili olmaktan çok gram negatif mikroorganizmalara ve lipopolisakkarit, PAF, TNF α , IL-6 veya NO gibi sitokinlere bağlı olarak ortaya çıkar (2, 7). NEK'li bebeklerin barsaklarında oluşan mukoza hasarı nedeniyle karbonhidrat emilim bozukluğu da olur. Bunun sonucunda karbonhidratlar kolonda fermente olarak gaitaya karışır ve bu, dışkıda saptanabilir. Fermentasyonun artması sonucu solunumla atılan hidrojen miktarı

da artar (70). Solunumsal hidrojen testinin negatif olması %99 başarıyla NEK'i ekarte ettirir (7).

2.1.5.3. Radyolojik Bulgular:

Ayakta direkt karın grafisinde genişlemiş barsak halkaları, hava-sıvı seviyeleri, barsak duvarını invaze etmiş bakterilerin fermentasyonla ortaya çıkardıkları hidrojen gazına bağlı olarak oluşan *pnömotozis intestinalis*, portal vende gaz ve sabit barsak halkası izlenebilir (2, 7, 68). Diafragma altında serbest hava görülmesi barsak perforasyonunu gösterir. Ultrasonografide barsaklardaki duvar kalınlaşması, asit ve portal vendeki gaz görülebilir (7, 71).

2.1.5.4. Evreleme :

NEK'in evrelemesi ilk defa 1973'de Bell tarafından yapılmıştır (10). Bu evreleme tedavi şeklinin planlanması ve takip açısından önemlidir. Buna göre birinci evre şüpheli olguları, ikinci evre NEK bulgularının kesin olduğu olguları üçüncü evre ise barsak nekrozunun olduğu olguları içerir (10). Öykü, klinik ve radyolojik bulgulara dayanarak oluşturulmuş Bell evrelemesi Tablo-2'de gösterilmiştir. Bu evreleme algoritması daha sonra Walsh ve Kliegman tarafından modifiye edilmiştir.(11)

Tablo-2: NEK'te Bell evrelemesi (10)

EVRE 1: (Şüpheli NEK)
➤ Öyküde bir ya da birden çok perinatal strese neden olabilecek faktör olması ➤ Sistemik bulgular: apne, letarji, ısı düzensizlikleri ve bradikardi ➤ Gastrointestinal bulgular: isteksiz beslenme, beslenme öncesi mide rezidüsü miktarında artış, kusma (safralı ya da gizli kan içerecek şekilde), hafif karın distansiyonu, fissür yokken gaitada gizli kan saptanması ➤ Radyolojik bulgular: ADKG'de genişlemiş barsak halkaları ve subileus
EVRE 2: (Kesin NEK)
➤ Birinci evredekilere ek olarak ➤ Devam eden gizli ya da bariz sindirim sistemi kanaması ve belirgin karın distansiyonu ➤ Karın grafisinde ciddi barsak genişlemesi ve ileus, barsak duvarında kalınlaşma, sabit barsak halkası, pnömotozis intestinalis ve portal vende gaz saptanması
EVRE 3: (İlerlemiş NEK)
➤ İkinci evredekilere ek olarak ➤ Vital bulgularda bozulma, septik şok bulgularının gelişmesi ve ciddi sindirim sistemi kanaması ➤ ADKG'de diafragma altı serbest hava görülmesi

2.1.6. Tedavi:

NEK'te tanının erken dönemde konması ve tedaviye erken başlanması yaşam şansını etkileyen en önemli faktördür. NEK'te cerrahi endikasyonlar ortaya çıkmadıkça medikal tedavi yapılmalıdır (2). NEK'li yenidoğanların üçte biri ila yarısı medikal tedavi ile iyileştirilebilir (72).

2.1.6.1 Medikal Tedavi:

Barsak nekrozu ve perforasyon işaretinin olmadığı durumlarda oral beslenmenin kesilmesi, nazogastrik dekompresyon, total parenteral beslenme (TPB) ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile medikal tedaviye başlanır (2, 68, 71, 73). Seçilen antibiyotik kombinasyonu bir penisilin türevi, bir aminoglikozid ve anaerobik mikroorganizmalara etkili bir antibiyotiği içermelidir. Bu hasta grubunda mantar enfeksiyonları da sık görüldüğünden sözü edilen antibiyotik kombinasyonunun yetersiz kaldığı durumlarda antifungal tedaviye başlamaktan çekinilmemelidir (2). Enteral antibiyotiklerin tedavide yeri yoktur (73). Barsak nekrozu ve perforasyonun tanısını erken koymak amacıyla 6-8 saatlik aralıklarla çekilen karın grafileri ile yakın takip yapılmalıdır (71). Yine sık aralıklarla kan sayımı, elektrolit, kan gazı ve kanama-pıhtılaşma değerlerinin kontrolü ve gerekiyorsa bunlara yönelik düzeltici girişimlerin zaman geçirmeden yapılması destekleyici tedavinin temelini oluşturur (2, 71, 73).

2.1.6.2. Cerrahi Tedavi:

NEK ön tanısı almış ya da NEK tanısı ile medikal tedavi uygulanan bebeklerde klinik gidişin bozulması, karında serbest hava saptanması, karın ön duvarında ödem ve eritem, karında kitle ele gelmesi, karın ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olması, radyolojik olarak portal vende gaz görülmesi cerrahi endikasyonu koydurur (2, 68, 71). Ancak bu cerrahi endikasyonlar herkes tarafından kabul edilmez. Hemen hemen tüm çocuk cerrahlarının üzerinde uzlaştıkları üç temel cerrahi endikasyon; diafragma altında serbest hava görülmesi, portal vende gaz görülmesi ve karın ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olmasıdır (2, 74). Karın ponksiyonunda barsak nekrozu işaretlerinin olması ya da başka bir deyişle pozitif parasentez diyebilmek için karından alınan sıvı 0.5 ml'den fazla, kahverenkli ve Gram boyasıyla boyandığında bakteri görülen özelliklerde olmalıdır (2, 72).

Cerrahi yöntem;

Genellikle göbek üstü sağ transvers insizyonla karın boşluğuna girilir. Karaciğerde subkapsüler hematoma oluşturma olasılığı göz önüne alınarak olabildiğince ekartör kullanmamaya gayret edilir. Peritoneal sıvıdan örnek alındıktan sonra tüm barsaklar mideden rektuma kadar incelenir (2, 72) .

Cerrahi tedavinin ana ilkeleri;

- Sadece perfore veya nekroze olduğu kesin olan barsak bölümünün rezeke edilmesi
- Barsakları mümkün olduğunca rezeksiyondan kurtarmaya çalışmak
- İleoçekal valvi korumak için azami gayreti göstermek
- Kanlanması şüpheli barsak bölümlerini hemen proksimalinden stoma açarak ikincil bir cerrahi girişime (second look) bırakmaktır (68, 72).

Cerrahi girişim sonrası kısa barsak sendromuna yol açmamak için bir çok cerrahi yaklaşım geliştirilmiştir.

Kanlanması tamamen bozulmuş ve nekroze olan barsak kesimleri rezeke edilmelidir. Bu durumda bazı operatörler geriye kalan kısmın uç-uca anastomoz yapılmasını önermektedir. Böylece ikinci bir operasyona ihtiyaç kalmayacağını ve stomanın yol açabileceği morbiditeden sakınılabileceğini savunmaktadırlar (75, 76, 77). Ancak halen daha çok kabul gören yaklaşım, nekroze olan barsak kısmının rezeksiyonu ile proksimal ve distal uçların çifteli tüfek namlusu şeklinde karın dışına alınmasıdır. Bu görüşü savunanlar ise anastomozun selameti açısından daha geniş bir rezeksiyonun tercih edilmesi gerekeceğini oysa stoma için böyle bir gerekliliğin olmadığını belirtmişlerdir (2, 71). Stoma tekniği olarak ise çifte namlusu (double barrel) şeklinde ileostomi yapılabileceği gibi birçok operatör Mikulicz tipi stomayı tercih etmektedir. Bu stoma yönteminin avantajı, stoma kapatılması sırasında yeniden laparotomi yapılmasına ihtiyaç olmamasıdır (72).

Kan dolaşımı bozulmuş ancak net olarak nekroz gelişmemiş barsaklar ise rezeke edildikleri zaman geride kalacak olan barsak 30 cm'den daha kısa ise bu alanın hemen proksimalinden bir stoma açılır ve kanlanması şüpheli alan yerinde bırakılır. Geride bırakılacak barsak üzerinde henüz perfore olmamış gangrenöz odaklar varsa –ki bu alanlar genellikle barsağın antimezenterik yüzündedir- bu alanlar enteroplasti yapıp lümene inverte edilerek bırakılabilir (2, 72).

Hastalığın birden çok barsak alanını tuttuğu durumlarda Vaughan ve arkadaşları tarafından bildirilen “clip and drop-back” tekniği uygulanabilir. Bu yöntemde birden çok rezeksiyon sonrası kalan barsakların uçları titanyum klipslerle kapatılır. 48-72 saat sonra tekrar eksplorasyon yapılır, kanlanması iyi olan barsak

kesimleri uç-uca anastomozlaştırılır (78). Bu tip olgularda bir diğer teknik de Lessin ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu yöntemde nekrotik barsak kısımları rezeke edildikten sonra anastomoz yapılmadan sağlam segmentler intraluminal bir stent üzerinde uç-uca getirilir. Birden çok barsak segmentinin tutulduğu iki NEK’li yenidoğanda kullanılan bu yöntemin olabildiğince uzun barsak kalmasını sağladığı bildirilmiştir (79).

Fulminan NEK ya da “NEC-totalis” olarak adlandırılan tabloda ise birçok olguda barsakların neredeyse tamamı tutulmuştur. Bu olgularda geniş rezeksiyon ve oldukça yüksek stoma yapılması çoğunlukla kaçınılmaz hale gelir ve bu durum kısa barsak sendromuyla sonuçlanacaktır.. (71) Böyle bir durumda cerrahın birkaç seçeneği vardır:

- Hiçbir şey yapmadan karnı kapatmak
- Nekrotik barsakları rezeke edip birden çok stoma açmak
- Hiç rezeksiyon yapmadan proksimal bir stoma açmak ve 48-72 saat sonra tekrar eksplorasyon yaparak (second-look) kanlanması düzelmiş barsak kesimleri varsa bunları kurtarmaya çalışmaktır.

Ancak her koşulda mortalite oranları çok yüksektir (2, 68, 72).

Yaygın nekroz ve çok sayıda perforasyon odağının olduğu olgularda yapılması önerilen bir teknik de Moore tarafından “yama, drene et ve bekle (patch, drain and wait) şeklinde formüle edilen barsak koruyucu yöntemdir (80).

Bu yöntemde;

- Yama (Patch) : Perforasyon bölgeleri transvers tek tabaka dikişle kapatılır.
- Drene et (Drain) : Her iki alt kadrandan çıkan iki adet penröz dren konur.
- Bekle (Wait) : Uzun süreli TPN ile beklenir. (80)

Nekrotik barsak rezeke edilmediği için bu prosedür devam eden sepsisi önlemez. Ayrıca periton boşluğunun drenajı güçtür ve perfore kısımda barsak duvarı çok ince olduğu için dikişle onarabilmek pek olası değildir (2, 7).

Genel durumu çok bozuk, operasyonu dahi tolere edemeyecek , çok düşük doğum tartılı ya da prematüre olgularda 1977’de Ein ve arkadaşları tarafından bildirilen primer peritoneal drenaj yöntemi kullanılabilir (81). Bu yöntemde laparotomisiz olarak yenidoğan yoğun bakım ünitesinde, hastanın yatağında, lokal anestezi ile her iki karın alt kadrana ve gerekiyorsa göbek üstünden yerleştirilen drenler vasıtasıyla peritoneal boşluk drene edilir. 24 saat içinde genel durumunda düzelme olmayan olgulara

laparotomi yapılır. Genel durumu düzelirse dren giriş bölgelerinin kendiliğinden stomalaşması için beklenir (81). Son dönemde operasyonun kendisinin dahi hasta için risk taşıdığı, seçilmiş olgularda primer peritoneal drenajın primer laparotomiden daha iyi sonuçlar sağladığını hatta kimi olgularda kesin tedavi edici bir yöntem olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (82, 83, 84).

Yine son dönemde Pierro ve arkadaşları tarafından bildirilmiş olan diğer bir yöntemse şüpheli NEK olgularında laparoskopi kullanımıdır (4). 11 olguluk NEK serisinde; 2 olgu laparoskopik olarak explore edilmiş bunlarda patoloji saptanmayıp çalışma dışı bırakılmış, diğer 9 olguya yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yapılan laparoskopide 3 olguda perforasyon saptanmıştır. 3 olguda perforasyon görülmemiş, kalan 3 olguda ise gangrenöze barsakla karşılaşmıştır. Bu olgulardan da birine laparoskopi rehberliğinde ileostomi yapılmıştır. Bu bulgular ışığında Pierro, laparoskopinin NEK'te kullanımının seçilecek cerrahi yöntemi belirlemede son derece yararlı olduğunu ve 1000 gramın altındaki çok düşük doğum ağırlıklı ve ağır stres altındaki bebeklerde dahi kullanışlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmiştir (5).

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

Çalışmamız İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 21 Mart 2006-6193 sayılı izni ile İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Histopatolojik inceleme İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji A.D.'da, biyokimyasal inceleme İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda yaşları 0-1 saat arasında, ağırlıkları 3,4-5,6 g arasında değişen toplam 44 adet Sprague-Dawley soyundan yenidoğan sıçan denek kullanılmıştır. Deney süresi boyunca 2 adet yenidoğan sıçan annelerinin terketmesi nedeniyle ortama adapte olamayarak ölmüştür. Diğer 2 denek ise 10 dakikalık hipoksi süresine dayanamayarak ölmüştür. Geri kalan 40 yenidoğan sıçan 4 ayrı gruba ayrılmıştır.

3.1. Deneysel NEK modelinin oluşturulması:

Çalışmamızda kullanılan yenidoğan sıçanlarda NEK oluşturmak için modifiye Okur yöntemi kullanılmıştır (20). Bu amaçla yenidoğan sıçanlara doğumdan hemen sonra, önce kapalı bir kavanozda %100 CO₂ solutuldu (Şekil-1). 10 dakika süren bu işlemin ilk dakikalarından itibaren gasping tipi solunum ve siyanoz geliştiği, son dakikalarda ise solunumun dışardan güçlükle izlenebilecek hale geldiği görüldü. Sonrasında kavanozun kapağı açılarak içindeki CO₂'nin boşalması sağlandıktan sonra +4 °C soğukta 10 dk bekletildiler. İleri derecede siyanoze ve apatik hale gelen sıçanlara bu defa kavanoz içinde 5 dk %100 O₂ solutuldu. Siyanozu düzelen denekler daha sonra annelerinin yanına bırakıldı. Bu işlem 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere 2 defa tekrarlandı.

Gruplar aşağıdaki şekilde belirlendi:

K grubu (Kontrol grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar hergün tartıldıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı ve herhangi bir işlem yapılmadı.

P grubu (Pnömoperitoneum grubu): Bu gruptaki denekler tartıldıktan sonra annelerinin yanına bırakıldı. 4. gün pnömoperitoneum yapıldı.

N Grubu (NEK grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa yukarıda bahsedilen işleme tabi tutuldular.

NP Grubu (NEK +Pnömooperitoneum grubu): Bu gruptaki yenidoğan sıçanlar 3 gün boyunca sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa yukarda bahsedilen işleme tabi tutuldular. 4. gün pnömooperitoneum yapıldı.

Tüm gruplardaki denekler 4. gün dekapitasyonla kurban edildi.

3.2. İntraabdominal CO₂ enfüflasyonu

50 mg/kg intraperitoneal kethamine hydrochloride (Ketalar flk., Eczacıbaşı/Pfizer, Türkiye) ile yapılan anestezi sonrası göbek kordonunun 0,5-1 cm üzerinden 24 gauge IV kanul (Ivflon, Venex International Ltd., Birmingham, UK) ile karın boşluğuna girildi (Şekil-2). Aesculap Flow25 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) enfüflatör ile 10 mmHg basınç, 1ml/dk akımda 30 dakika CO₂ enfüfle edildi. Cilt altına kaçak olursa kanülün girdiği delik 7/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon Inc., Johnson and Johnson Medical Products, New Jersey, USA) suture ile kapatılarak hemen altından tekrar karın boşluğuna girildi. Sonrasında 30 dakika desüflasyon yapıldı.

Çalışmamızda pnömooperitoneum oluşturmada teknik bir zorlukla ya da işlem sırasında barsak yaralanması, damar yaralanması gibi herhangi bir sorunla karşılaşmadı.

Denekler işlemten hemen sonra kurban edildi. Orta hat kesisi ile karın boşluğuna girilip histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için terminal ileumdan 1,5-2 cmlik biyopsiler alındı (Şekil-3). Alınan biyopsi materyalinin yarısı biyokimyasal inceleme için ayrıldı. Serum fizyolojikle yıkanarak, üzerindeki kan ve diğer çevresel dokulardan ayrılan ileum parçası -80°C'lik derin dondurucuya kondu. Histopatolojik inceleme için ayrılan ileum parçası ise % 10'luk formaldehit solusyonu içinde tespit edildi.

3.3. Biyokimyasal İnceleme:

Tüm dokular tartıldıktan sonra doku homojenatları 0,13 M KCL'de hazırlandı. Tüm analizlerde aynı homojenat kullanıldı.

3.3.1. TBARS analizi: Dokuda lipid peroksidasyonunun belirteci olarak TBARS (Tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler-Thiobarbituric acid reactive substances) miktarı Buege ve Aust yöntemi kullanılarak ölçüldü (85). 1 hacim homojenat 2 hacim %15 (w/v) trikloroasetik asit, %0,375 (w/v) tiobarbitürik asit ve 0,25 M hidroklorik asit içeren reaktif ile karıştırıldı. 30 dakika kaynar su banyosunda

tutulduktan sonra 1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı spektrofotometrede 535 nm'de okundu. TBARS konsantrasyonu molar absorbans coefficienti ($1,56 \times 10^{-5} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. TBARS için intra ve interassay cv sırasıyla %3 ve %4 bulundu. Sonuçlar nmol /mg protein olarak ölçüldü.

3.3.2. Glutasyon (GSH) analizi: Dokudaki sülfidril bileşiklerini tayin eden Ellman yöntemi ile (86) doku GSH düzeyleri saptandı. Homojenat önce metafosforik asit ile proteinsizleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant %40 (w/v) 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona sokuldu. Oluşan rengin absorbansı 412 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. GSH konsantrasyonu hesabı için molar absorbans coefficienti ($13,6 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol/mg}$ doku proteini olarak ölçüldü. GSH analizi için intra ve interassay cv sırasıyla %2,8 ve %3,5 bulundu.

3.3.3. Nitrik Oksit (NO) analizi: Doku NO konsantrasyonu enzimatik kit (Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit, BioVision, Inc., California, USA) kullanılarak nitrit + nitrat olarak belirlendi (87). Nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite indirgendiikten sonra nitrit konsantrasyonu 430 nm boyunda Griess ayracı ilavesi ile spektrofotometrik olarak saptandı. Hazırlanan nitrit ve nitrat standart grafiklerine göre sonuçlar değerlendirildi. NO için intra ve interassay coefficient variation sırasıyla %4 ve %5 bulundu. Sonuçlar pmol/mg doku proteini olarak ölçüldü.

Doku proteini tayini: Protein konsantrasyonu Lowry ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle saptandı (88).

3.4. Histopatolojik İnceleme:

İleoçekal valvin hemen proksimalinden alınan yaklaşık 1,5-2 santimetre uzunluğundaki terminal ileum segmenti %10'luk formaldehit solusyonu içinde oda ısısında tespit edildi. Tespit edilen dokular İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda parafin bloklar haline getirildi. Bu bloklardan alınan 3-5 mikrometre kalınlığındaki doku kesitleri hematoksilin-eozin (H-E) boyasıyla boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değerlendirme için barsaktaki morfolojik değişiklikler 0'dan 4'e kadar evrelendi. Buna göre:

- Evre 0: Normal ileum dokusu (Şekil-4),
- Evre 1: Villus yüzey epitelinde dejeneratif değişiklik (Şekil-5),

- Evre 2: Fokal villus yüzey epiteli nekrozu (Şekil-6),
- Evre 3: Yaygın yüzey epiteli nekrozu, epitel bazal membranında ayrışma, villus düzensizliği
- Evre 4: Transmukozal/fokal transmural nekroz ve villus atrofisi (Şekil-7) olarak belirlendi.

3.5 İstatistiksel değerlendirme:

Biyokimyasal inceleme sonuçlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için ANOVA ve Tukey HSD testleri, histopatolojik sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi içinse Mann Whitney-U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı.



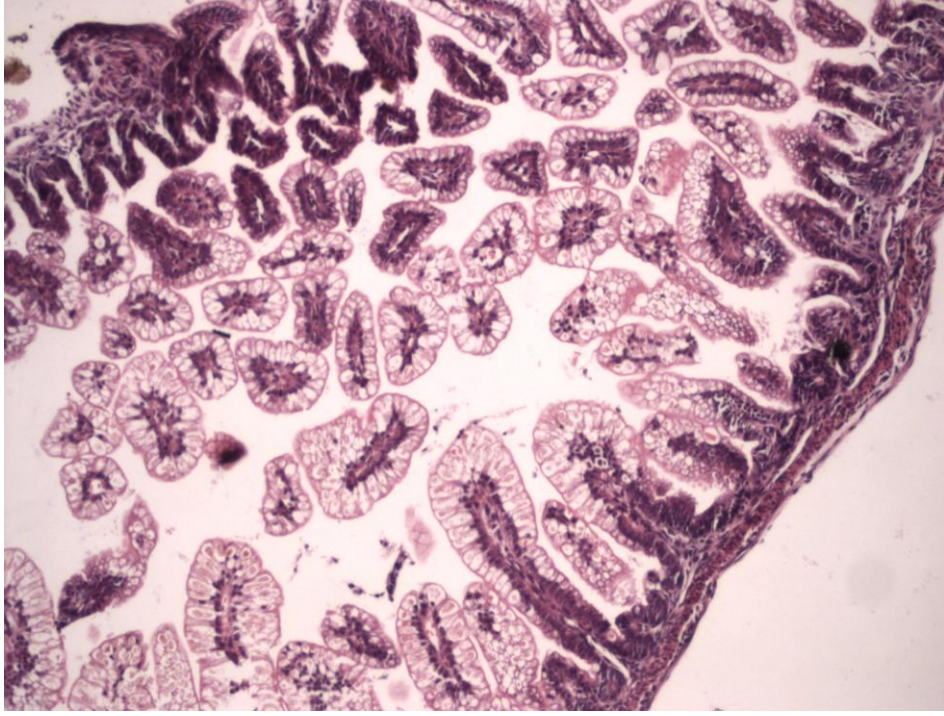
Şekil-1: Hipoksi oluşturmak için kullanılan hava sızdırmaz düzenek.



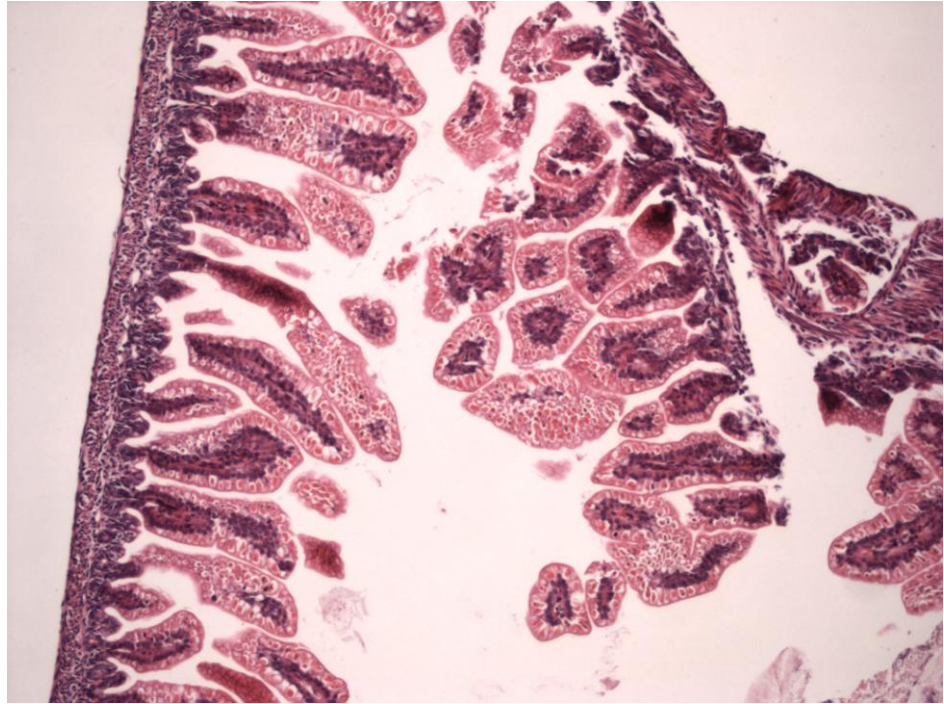
Şekil-2: Pnömooperitoneum oluşturmak için karın boşluğuna girilmesi.



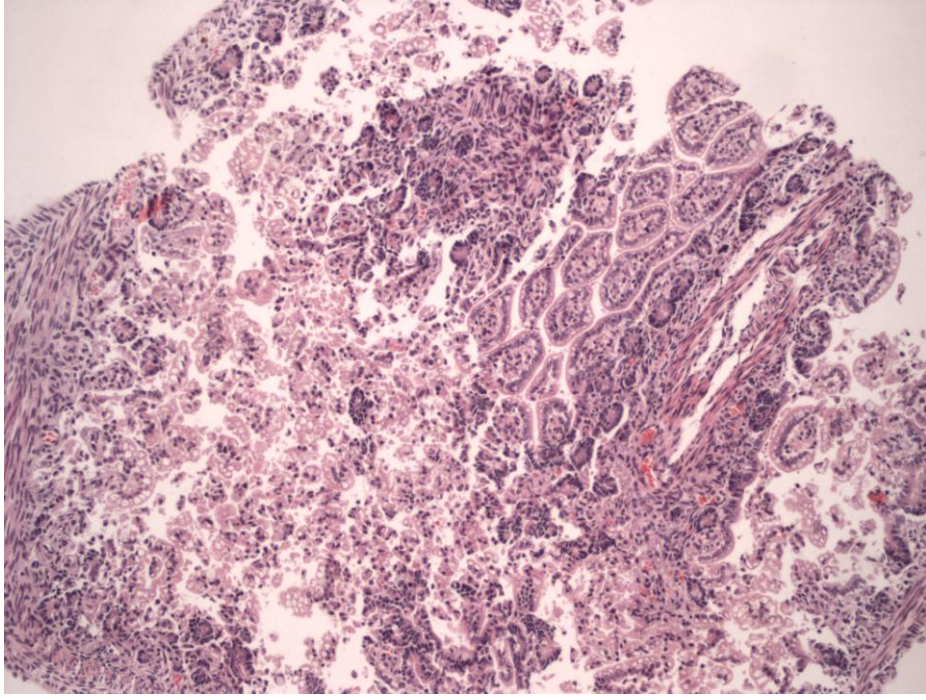
Şekil-3: N grubundaki bir deneğin barsaklarının görünümü.



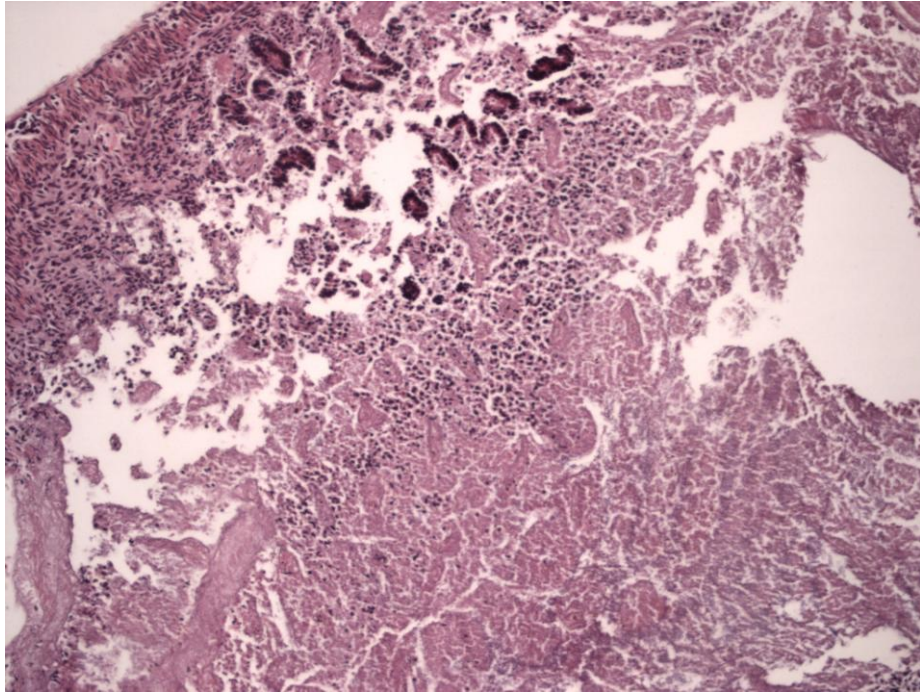
Şekil-4: Normal ileum dokusu. (H-E, x100)



Şekil-5: Evre 1 değışiklik. (H-E, x100)



Şekil-6: Evre 2 değışiklik. (H-E, x100)



Şekil-7: Evre 4 değışiklik (H-E, x100)

4. BULGULAR

4.1. TBARS Sonuçları:

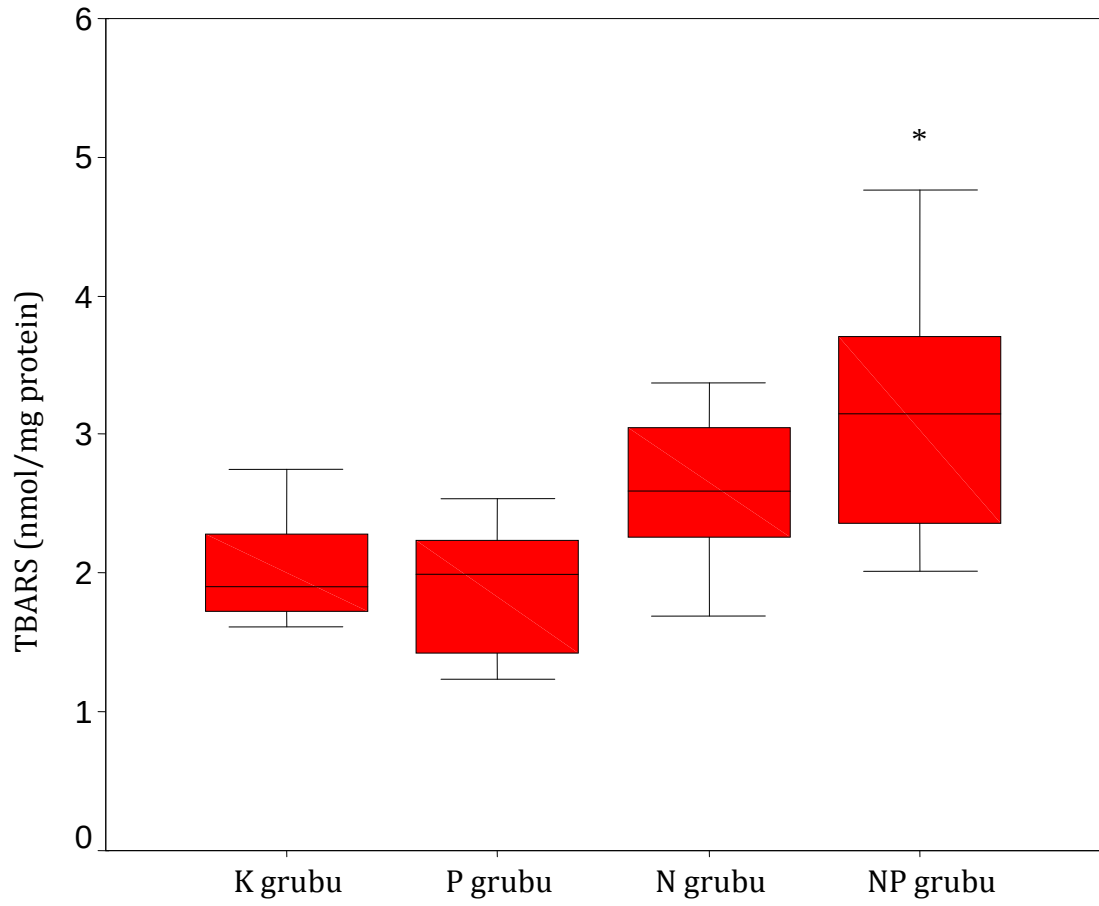
Dokuda lipid peroksidasyonunun belirteci olarak TBARS (Tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler-Thiobarbituric acid reactive substances) miktarı Buege ve Aust yöntemi kullanılarak ölçüldü (85).

Buna göre kontrol grubunda (K grubu) TBARS düzeyi ortalama $2,01 \pm 0,37$ nmol/mg protein bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $1,91 \pm 0,49$ nmol/mg protein, N grubunda ortalama $2,60 \pm 0,51$ nmol/mg protein, NP grubunda ise ortalama $3,21 \pm 0,88$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. TBARS değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun değerlerinin K ve P gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0.001$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Ortalama ve standart sapmalar Tablo-3'te özetlenmiştir. TBARS düzeyleri farklılığı Şekil-8'de gösterilmiştir.

Tablo-3: Tüm gruplardaki TBARS düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları.

(*: Standart sapma)

GRUPLAR	ORTALAMA (nmol/mg protein)	SS*	p
K GRUBU	2,01	0,37	
P GRUBU	1,91	0,49	
N GRUBU	2,60	0,51	
NP GRUBU	3,21	0,88	,001



Şekil 8: Tüm gruplardaki TBARS değerlerinin farklılık tablosu

* : N P grubunun T B A R S değerleri K ve P gruplarına göre anlam lı derecede daha yüksektir. ($p < 0.001$)

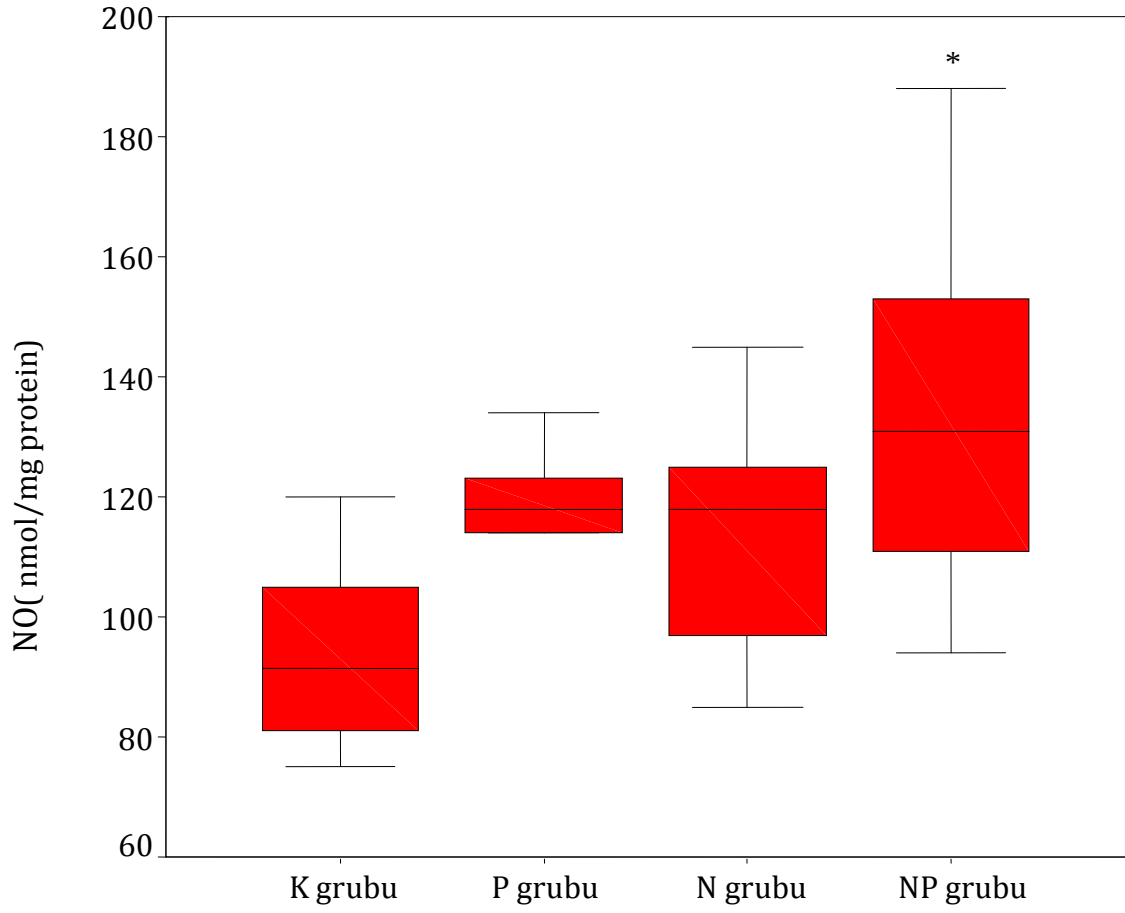
4.2. NO Sonuçları:

Doku NO konsantrasyonu enzimatik kit (Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit, BioVision, Inc., California, USA) kullanılarak nitrit + nitrat olarak belirlendi (87).

Buna göre kontrol grubunda (K grubu) NO düzeyi ortalama $93,20 \pm 14,77$ nmol/mg protein bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $117,83 \pm 11,30$ nmol/mg protein, N grubunda ortalama $114,50 \pm 18,07$ nmol/mg protein, NP grubunda ise ortalama $132,10 \pm 29,40$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. NO değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun değerlerinin K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0.001$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Ortalama ve standart sapmalar Tablo-4'te özetlenmiştir. NO düzeyleri farklılığı Şekil-9'da gösterilmiştir.

Tablo-4: Tüm gruplardaki NO düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları. (*: Standart sapma)

GRUPLAR	ORTALAMA (nmol/mg protein)	SS*	P
K GRUBU	93,20	14,77	
P GRUBU	117,83	11,30	
N GRUBU	114,50	18,07	
NP GRUBU	132,10	29,40	,001



Şekil 9: Tüm gruplardaki NO değerlerinin farklılık tablosu

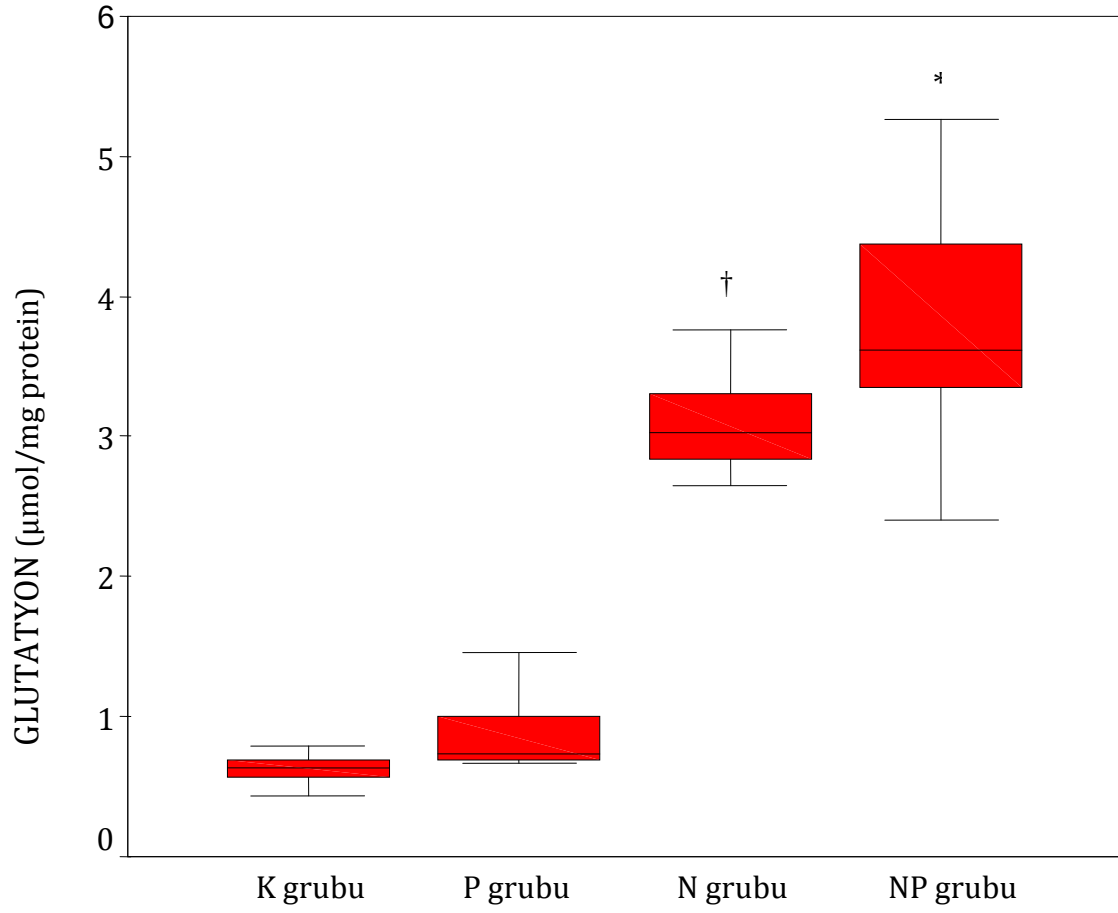
* : NP grubunun NO değerleri K grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir.
($p < 0.001$)

4.3. GSH Sonuçları:

Dokudaki sülfidril bileşiklerini tayin eden Ellman yöntemi ile (86) doku GSH düzeyleri saptandı. Buna göre kontrol grubunda (K grubu) GSH düzeyi ortalama $0,62 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/mg}$ protein bulundu. P grubunda bu değer, ortalama $0,88 \pm 0,31$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, N grubunda ortalama $3,11 \pm 0,38$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, NP grubunda ise ortalama $3,78 \pm 0,86$ $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur. GSH değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun değerlerinin K, P ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0.001$), N grubunun değerlerinin de K ve P grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p < 0.001$), K ve P grupları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Ortalama ve standart sapmalar Tablo-5'te özetlenmiştir. GSH düzeyleri farklılığı Şekil-10'da gösterilmiştir.

Tablo-5: Tüm gruplardaki GSH düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları. (*: Standart sapma)

GRUPLAR	ORTALAMA ($\mu\text{mol/mg}$ protein)	SS*	P
K GRUBU	0,62	0,10	
P GRUBU	0,88	0,31	
N GRUBU	3,11	0,38	,001
NP GRUBU	3,78	0,86	,001



Şekil-10: Tüm gruplardaki GSH değerlerinin farklılık tablosu

* : NP grubunun GSH değerleri K, P, ve N gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksektir. ($p < 0.001$)

† : N grubunun GSH değerleri K ve P gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksektir. ($p < 0.001$)

4.4. Histopatolojik değerlendirme sonuçları:

Işık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede kontrol grubunda Evre 1 değişiklik görülen bir denek dışında hiçbir denekte doku hasarı görülmedi. P grubunda ağırlıklı olarak Evre 2 değişiklik izlendi. 2 Denekte Evre 1 değişiklik görüldü. N grubunda da Evre 1 hasar görülen 2 denek dışındaki tüm deneklerde histopatolojik olarak Evre 2 değişiklikler görüldü. NP grubunda ise bir denekte Evre 4, diğer tüm deneklerde Evre 2 değişiklikler izlendi. Bu bulguların istatistiksel değerlendirmesi sonucunda P, N ve NP gruplarının histopatolojik doku hasarı evreleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol grubu dışındaki grupların kendi aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Doku hasarının histopatolojik evrelerinin gruplara göre dağılımı, ortalama ve standart sapmalar Tablo-6'da özetlenmiştir.

Tablo-6: Doku hasarının histopatolojik evrelerinin gruplara göre dağılımı. (*: Standart sapma)

GRUPLAR	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Ortalama (Evre)	SS	P
K GRUBU	9	1	-	-	-	0,10	0,31	
P GRUBU	-	2	8	-	-	1,80	0,42	
N GRUBU	-	2	8	-	-	1,80	0,42	
NP GRUBU	-	-	9	-	1	2,20	0,63	,001

5.TARTIŞMA

NEK 1960'lı yıllarda yenidoğan yoğun bakım koşullarının düzelmesiyle birlikte sıklığı giderek artan ve bugün itibariyle yenidoğanlarda en sık cerrahi girişim gerektiren sindirim sistemi hastalığıdır (1, 2, 68). Etiyolojide prematürite, iskemi ile oluşan barsak mukoza bariyer hasarı, bazı enfeksiyon ajanları, enteral beslenme ve bazı ilaçların etkili olduğu düşünülmektedir.

NEK oluşumunda ana faktörlerden biri olarak nitelenen iskeminin önemi klinik ve deneysel çalışmalarla desteklenmiştir. NEK etyopatogenezinde iskeminin önemli rol üstlendiğini öne sürenler NEK'li bebeklerin en az %80'inin zor doğumlar sonucunda dünyaya geldiğini belirtmişlerdir (28, 89, 90). Barlow ve Santulli yaptıkları çalışmada hipoksi ve soğuk stresine maruz bırakılan yenidoğan sıçanlarda NEK geliştiğini göstermişlerdir (9). Buna göre her gün 3-5 dakika hipoksi ve +7 °C'de soğuk stresine maruz bırakılan sıçanların tamamında 4. gün sonunda NEK geliştiğini bildirmişlerdir. Szabo ve arkadaşlarının 1985'te ve Cohen ve arkadaşlarının da 1991'de domuz yavrularında hipoksinin intestinal mukozal kan akımını azalttığını ve bunun mukozada iskemik değişiklikler oluşturduğunu göstermesi sonrasında (91, 92). Okur ve arkadaşları tarafından yenidoğan sıçanlarda geliştirilen hipoksi-reoksijenasyona dayalı deneysel NEK modeli birçok çalışmada kullanılmıştır (19, 93, 94, 95). Okur ve arkadaşları 3 gün boyunca yenidoğan sıçanlarda önce 5 dakika % 100 karbondioksit solutarak hipoksi, daha sonra 5 dakika %100 oksijen solutarak reoksijenasyon sağladıklarını; bunun sonucunda tüm deneklerin barsak kesitlerinde ışık mikroskobu ile rahatlıkla izlenebilen NEK'in karakteristik değişikliklerini oluşturduklarını bildirmişlerdir (20). Deneysel NEK yöntemlerinden bir diğeri de Caplan ve arkadaşlarının tarif ettikleri yöntemdir. Bu yöntemde 21. gebelik gününde sezaryen ile doğurtulan yenidoğan sıçanların anne sütü almaları engellenmiş ve sonraki günlerde formula mamayla beslendikleri belirtilmiştir. Aynı zamanda günde iki defa 50 saniye %100 nitrojen gazı solutularak hipoksik , sonrasında ise 10 dakika +4 °C soğuk strese maruz bırakılan yenidoğan sıçanlarda NEK geliştiğini bildirmişlerdir (96) .

Biz, çalışmamızda NEK modeli olarak Okur ve arkadaşlarının yöntemini soğuk stresini ekleyerek ve hipoksi-reoksijenasyon süresini uzatarak uyguladık. Bu yöntemi bizden önce uygulamış olan Özkan ve arkadaşlarından (95) farklı olarak biz

sözkonusu işlemleri 3 gün uygulayıp, sakrifikasyonu 4. gün gerçekleştirdik. Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni hipoksi ve soğuk stresine dayalı yöntemin bildirilmiş sonuçlarının tatminkar düzeyde olması, kolay uygulanabilir olması, tamamen anne bağımlı yenidoğan sıçanlarda formula mama ile oluşturulacak bir modelin ileri derecede uygulama gücü ve kişiye özgü uygulama hatalarına açık oluşudur. Çalışmamızda histopatolojik incelemede, NEK gruplarındaki (N ve NP grupları) 20 deneğin ikisinde Evre 1 (%10), 17'sinde Evre 2 (%85) ve birinde Evre 4 (%5) değişiklik görülmüştür. Bu bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NEK grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir. Özellikle N grubu ile K grubu arasındaki farklılık modelin tutarlılığını desteklemektedir. .

NO düzeyi, nitrik oksit sentazın (NOS) 3 izoformu tarafından kontrol edilmektedir. NO vücutta hem pro-oksidan hem de anti-oksidan etkiye sahip bir moleküldür. Bu etkinlik NOS'un hangi izoformu tarafından sentezlendiği ile yakın ilişkilidir. Şöyle ki NOS1 (nNOS) ve NOS3 (eNOS), picomol düzeyinde NO üretirler ve NO'nun kısa sürede, az miktarda yapımından sorumludurlar. NO'nun sitoprotektif ve antioksidan etkileri bu izoenzimler aracılığıyla ortaya çıkar. NOS2 (iNOS) ise intestinal enflamasyonda hızla eksprese olarak NO yapımını NOS1 ve NOS3' göre daha hızlı ve yüksek miktarda artırır. Bu şekilde oluşan NO, superoksitler ile etkileşime girerek oldukça reaktif bir iyon olan peroksinitrite dönüşür ve lipid peroksidasyonu başlar. Peroksinitrit, intestinal hücrelerde apoptozise neden olur ve apikal villuslarda soyulma meydana gelir. Bu da bakteriyel yapışmayı, dolayısıyla bakteriyel translokasyonu kolaylaştırır (62, 63, 97, 98, 99, 100, 101). Yarı ömrü çok kısa olan NO düzeyleri direkt ya da dolaylı olarak iki farklı şekilde ölçülebilir. Direkt yöntemde iNOS mRNA gen ekspresyonu ile NO düzeyi tayin edilebilir (63). Dolaylı yöntemde ise NO metabolizmasının son ürünleri olan nitrit-nitrat miktarları ölçülür (102). Çalışmamızda NO düzeyi nitrit-nitrat miktarlarının Griess yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle saptanmıştır. (87)

Glutasyon antioksidan detoksifiye edici sistemi, barsak bariyerinin toksik oksidanlara yanıtında önemli bir rol oynar (64, 65, 101, 103, 104, 105). Bhatia ve arkadaşları 10 günlük yenidoğan sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada glutasyon düzeylerinin iskemi grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğunu belirtmişlerdir (106). Kelly ve arkadaşları da yenidoğan sıçanlarda formula mama ve hipoksiyle oluşturdukları NEK modelinde ileumda glutasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre

daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (104). Hall ve arkadaşları ise 16'sı NEK'li, 10'u da kontrol grubundan oluşan 26 yenidoğanın kan glutatyon düzeylerine bakmışlar ve iki grup arasında fark olmadığını bildirmişlerdir (65). Biz de çalışmamızda, barsak bariyerinin antioksidan savunma kapasitesini değerlendirmek amacıyla ileal dokuda Glutatyon düzeylerini Ellman yöntemi ile ölçtük.

Laparoskopide oluşturulan pnömoperitoneumun yan etkileri pnömoperitoneum için kullanılan gazın cinsine ve intraabdominal basınç artışına bağlıdır. En sık kullanılan gaz olan CO₂'nin intraperitoneal insüflasyonunun, diafragma yükselmesi ve vagal uyarı gibi lokal etkilerin yanı sıra hiperkarbi, asidoz ve kardiyak önyükte artma gibi sistemik etkilere yol açtığı bilinmektedir (6, 107). Ayrıca CO₂'in kendisinin de diğer gazlara oranla daha fazla sistemik asidoz ve iskemik organ hasarına neden olduğu gösterilmiştir (108). İntrabdominal basınç artışının en önemli etkilerinden biri, ince barsakta iskemiye neden olan mezenterik arter kan akımındaki azalmadır. İntestinal mukoza, intestinal mukozal bariyer hasarına yol açan iske miyle ilişkili çeşitli sistemik ve bölgesel faktörlere son derece hassastır. İnsanlarda yapılan klinik çalışmalarda ve hayvan deneylerinde, 10 mmHg'lık intraabdominal basıncın herhangi bir yan etkiye yol açmadığı, buna karşılık 15 mmHg'lık intraabdominal basıncın splanknik sistem ve parietal peritondaki kan akımını azalttığı bildirilmiştir (109, 110, 111, 112). Kaya ve arkadaşları erişkin tavşanlarda yaptıkları deneyde 15 mmHg basınç ile oluşturulan pnömoperitoneum ile barsakta herhangi bir histopatolojik değişiklik olmadığını bildirmiştir (113). Artmış intrabdominal basıncın intestinal dokular üzerindeki etkisi sadece mekanik etkiye bağlı olmayıp, hü moral mekanizmalarla oluşan vazokonstrüksiyona da bağlıdır (114). Jacobi ve arkadaşları TNF α ve IL-10'un sıçanlardaki plazma düzeylerini 8 mmHg basınç ve 30 dakika süreyle uygulanan intraabdominal CO₂ veya Helyum insüflasyonundan sonra değerlendirmişler; Helyum ve kontrol gruplarıyla kıyaslandığında CO₂ grubunun TNF α plazma düzeylerini düşük, IL-10 düzeylerini yüksek bulmuşlardır (115). Säng er ve Gutt ise sıçanlarda 8 mmHg basınç ve 60 dakika süreyle uygulanan pnömoperitoneum sonrası NOS'un 3 izoformunun düzeylerini ölçmüşler; duodenum ve peritonda iNOS (NOS2) düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Bu artışın, laparotomi grubundaki kadar yüksek olmasa da; gazsız laparoskopi grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir (115). Cevrioğlu ve arkadaşları tarafından erişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada bir gruba 60 dakika süreyle 15 mmHg basınçla intraabdominal CO₂ insüflasyonu, sonrasında 30

dakika desüflasyon yapılmış. Diğer bir gruba ise aynı sürelerde 10 mmHg basınçla insüflasyon, sonrasında desüflasyon yapılmıştır. Daha sonra eritrosit ve peritonda GSH düzeylerini incelemişlerdir. Eritrosit GSH düzeyleri açısından kontrol grubuyla diğer gruplar arasında fark saptayamadıklarını, doku GSH düzeylerinin ise 15 mmHg'lık grupta kontrol grubuna göre belirgin derecede azalmış olduğunu bildirmişlerdir (116).

Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulanan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir (101). Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu belirlemek için TBARS değerlerini kullandık. Ünsal ve arkadaşları erişkin sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada artmış intraabdominal basıncın terminal ileumda yarattığı biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri araştırmışlar; 10 ve 20 mmHg basınç ve 60 dakika süreyle uygulanan CO₂ pnömoperitoneum ile doku MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olduğunu, histopatolojik olarak da mukoza ve submukozada belirgin değişikliklerin oluştuğunu bildirmişlerdir (117). Emir ve arkadaşları ise erişkin tavşanlar üzerinde yaptıkları laparoskopinin intestinal iskemiye neden olup olamayacağına yönelik deneysel çalışmalarında; bir gruba 20 dk süreyle, intraabdominal basınç sistolik kan basıncını geçmeyecek şekilde CO₂ pnömoperitoneum, diğer gruba ise 25 dakika süreyle laparotomi yapmışlar ve sonrasında ince barsak ve kolonda MDA ve ksantin oksidaz (XO) düzeylerini ölçmüşlerdir. Pnömoperitoneum grubunda hem kolon hem de ince barsakta MDA düzeylerinde belirgin bir yükselme görmediklerini, XO düzeyleri açısından ise kolonda anlamlı derecede artış gördüklerini ancak ince barsak XO düzeyleri açısından anlamlı fark saptamadıklarını bildirmişlerdir (6).

NEK'te laparoskopinin kullanımı ile ilgili deneyim ve yayınlar çok az sayıdadır. Pierro ve arkadaşları NEK cerrahisinde yeni bir yaklaşımı bildirdikleri klinik çalışmalarında NEK ön tanısıyla cerrahi girişim gerektiren 11 olguda laparoskopik eksplorasyon yapmışlardır. Pnömoperitoneum işlemi 15 mmHg basınç ve 2 l/dk akım ile CO₂ kullanılarak oluşturulmuştur. 9 olguda NEK saptanan seride ortalama eksplorasyon süresinden bahsedilmemiştir. (4)

NEK'li yenidoğan bebeklerde güvenle uygulanabilirliği bildirilen

laparoskopinin, gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini irdelemek amacıyla planlanladığımız çalışmamızda; biz bu tip bir eksplorasyonun en kısa süresinin 30 dakika civarında olacağını varsayarak insuflasyon süresini 30 dakika olarak belirledik. Yine İngilizce ve Türkçe literatürde yaptığımız araştırmada yenidoğan sıçanlarda bildirilmiş bir pnömoperitoneum modeline rastlayamadık. Bunun üzerine hem yenidoğan bebeklerde kullandığımız hem de literatürde biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin meydana geldiği asgari basınç olarak bildirildiği için basıncı 10 mmHg olarak belirledik. Pnömoperitoneum oluşturmada, klinikte kullanımı genel kabul gören ve rutin olarak kullandığımız CO₂'i tercih ettik.

Çalışmamızda K grubunda beklenildiği gibi histopatolojik incelemede bir denek dışında normal, sağlıklı yapıda villuslar belirlenmiş ve tüm biyokimyasal değerler temel kabul edilmiştir.

N grubunda , doku TBARS ve NO düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir farklılık izlenmemiş, buna karşılık doku GSH düzeyleri ile doku hasarının histopatolojik evresi K grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

P grubunda, doku TBARS , NO ve glutatyon düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış izlenmemiştir. Ancak oluşan doku hasarının histopatolojik derecesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

NP grubunda, doku TBARS, NO ve glutatyon düzeyleri ile doku hasarının histopatolojik derecesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. NP grubunun değerleri P ve N grubuyla karşılaştırıldığında, glutatyon düzeyleri NP grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuş, ancak doku NO düzeyleri ve doku hasarının histopatolojik derecesinde farklılık saptanmamıştır. NP grubu ile diğer gruplar TBARS düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; NP grubunda P grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, N grubuna göre farklı bulunmamıştır.

P ve N grupları, kendi aralarında kıyaslandığında N grubunun sadece doku glutatyon düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup; TBARS, NO ve doku hasarının histopatolojik dereceleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu bulgular ışığında, oluşturduğumuz NEK modeli irdelendiğinde; oluşan histopatolojik değişiklikler yeterli düzeydedir. Doku NO ve TBARS düzeylerinde anlamlı değişiklik olmaması GSH düzeyindeki yükselişe bağlı olabilir. GSH, antioksidan savunma mekanizmasının oksidatif stresin belli bir düzeyin ötesine geçmesini engelleyerek bu sonuçların elde edilmesini sağlamış olabilir.

P grubunda NO, TBARS ve GSH düzeylerinde artış olmadan histopatolojik değişiklik izlenmesi, pnömoperitoneum oluşturmak için seçtiğimiz 10 mmHG basıncın yenidoğan sıçanların splanknik dolaşımını bozduğu ve bazı histolojik değişikliklere neden olabildiği yönünde yorumlanabilir. Ancak çalışmamızda biyokimyasal değişiklikleri saptayabilmek için denekler işlemiden kısa süre sonra kurban edildiği için, histolojik değişikliklerin uzun dönemde kalıcı olup olmadığını değerlendirmek mümkün olmamıştır.

NP grubundaki NO ve TBARS düzeyleri ile histopatolojik hasar derecelerinin N grubuna göre farklı olmaması, GSH düzeylerinin ise anlamlı derecede yükselmiş olması CO₂ pnömoperitoneumun NEK'te oluşan doku hasarına herhangi bir olumsuz katkısı olmadığı yönünde değerlendirilmiştir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda yenidoğan sıçanlarda oluşturulan NEK modelinde CO₂ pnömoperitoneumun barsak üzerine etkileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmıştır.

- 1- Yenidoğan sıçanlarda 3 gün süreyle tekrarlanan hipoksi-reoksijenasyon ve hipotermi yöntemiyle ileumda NEK'e ait histopatolojik değişiklikler oluşturulmuştur.
- 2- NEK grubunda NO, TBARS düzeylerinin normal sınırlarda kalması, buna karşılık GSH değerlerinin anlamlı derecede yüksek bulunması antioksidan savunma mekanizmasının oksidatif stresin belli bir düzeyin ötesine geçmesini engellemesi olarak yorumlanabilir.
- 3- Pnömoperitoneum grubunda histopatolojik değişiklik izlenmesi, pnömoperitoneum oluşturmak için seçtiğimiz 10 mmHG basıncın yenidoğan sıçanların splanknik dolaşımını bozduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle yenidoğan sıçanlarda farklı basınç ve sürelerde pnömoperitoneumun etkilerinin araştırıldığı çalışmalara gereksinim vardır.
- 4- NP grubu ile N grubunun biyokimyasal ve histopatolojik sonuçları karşılaştırıldığında CO₂ un NEK'te oluşan doku hasarına olumsuz bir katkısı olmadığı gözlenmiştir.
- 5- Yeni klinik çalışmalarda NEK'li ve düşük doğum tartılı bebeklerde tanısal ve girişimsel laparoskopinin güvenli ve etkin bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Benzer bir deneysel hayvan modeli üzerinde yaptığımız çalışmanın sonuçları, başlangıç aşamasında olan bu yeni uygulamayı destekler niteliktedir.

7. ÖZET

Amaç: NEK’li yenidoğanlarda güvenle uygulanabilirliği bildirilen laparoskopinin, gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Yöntem ve gereç: 40 adet Sprague-Dawley yenidoğan sıçan onlu 4 gruba ayrılmıştır. K grubu, işlem yapılmayan kontrol ; L grubu, işlem yapılmadan 4. gün 10 mm Hg basınçta 30 dakika karbondioksit , 30 dakika desüflasyon yapılan; N grubu modifiye Okur yöntemiyle NEK oluşturulan; NP grubu ise N grubundaki işlemlere ek olarak 4. gün P grubundaki gibi pnömoperitoneum-desüflasyon oluşturulan gruplar olarak belirlenmiştir. Denekler 4. Gün dekapitasyonla kurban edilmiş ve terminal ileum rezeke edilerek histopatolojik değişiklikler ile Nitrik oksit, Glutasyon ve TBARS düzeyleri incelenmiştir. Biyokimyasal incelemelerin istatistiksel değerlendirilmesi için ANOVA ve Tukey HSD , histopatolojik sonuçlar için Mann Whitney–U ve Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır.

Bulgular: TBARS değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun K ve P gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu, diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. NO değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. GSH değerleri karşılaştırıldığında NP grubunun K, P ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu, N grubunun K ve L grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, K ve P grupları arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur. P, N ve NP gruplarının histopatolojik evreleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, bu grupların kendi aralarında bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda CO2 pnömoperitoneumun NEK’teki doku hasarına ek bir olumsuz katkısı olmadığı gözlenmiştir. Deneysel hayvan modeli üzerinde yaptığımız bu çalışmanın sonuçları, klinikte yeni kullanılmaya başlanan NEK’te laparoskopik tanı uygulamasının güvenilirliğini destekler niteliktedir.

8. SUMMARY

EFFECT OF CARBONDIOXIDE INSUFFLATION ON BOWEL IN AN EXPERIMENTAL NEC MODEL

Aim: To evaluate the effects of laparoscopy, which is reported to be safely applied in newborns with NEC, on the gastrointestinal tract.

Materials and Methods: 40 newborn Sprague-Dawley rats were divided into four different groups of ten. Group K was the control with no intervention whereas Group P was subjected to 10 mm Hg pressure carbondioxide pneumoperitoneum for 30 minutes followed by desufflation for 30 minutes on the fourth day of the study. Rats in Group N were NEC models established by the method described by Okur. Group NP was subjected to pneumoperitoneum-desufflation on the fourth day of the study as Group P in addition to the procedures applied on Group N.

Subjects were decapitated on the fourth day and histopathological findings, Nitric Oxide, Glutation and TBARS levels were investigated on the resected terminal ileum. Statistical evaluation of biochemical results were done with ANOVA and Tukey HSD tests, whereas Mann Whitney-U and Kruskal Wallis tests were used for the histopathological results.

Results: TBARS levels were significantly higher in Group NP compared to Group K and P. However, a significant difference was not determined between the other groups. NO levels were significantly higher in Group NP than in Group K. There was no significant difference between the other groups. When GSH levels were compared, Group NP was found to have significantly higher GSH levels than Groups K, P and N. Additionally, GSH levels were significantly higher in Group N when compared with Groups K and P. There was no significant difference between Groups K and P. Histopathological stages of Groups P, N and NP were found to be significantly higher, whereas no difference was observed among these groups.

Conclusion: In our study, we demonstrated that carbondioxide pneumoperitoneum does not have a negative contributing effect on the tissue damage seen in NEC. The results of this animal model study support the safety of diagnostic laparoscopy, a newly used method, in NEC.

9. KAYNAKLAR

- 1) St. Peter SD, Ostlie DJ. Necrotizing enterocolitis. In: Ashcraft KW, Holcomb GW, Murphy JP (eds): Pediatric Surgery. 4th ed., Philadelphia, Elsevier Inc.; 2005: 461-76.
- 2) Başaklar AC. Yenidoğanlarda gastrointestinal kanama. İçinde : Başaklar AC (editör): Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık; 2006:757-82.
- 3) Wilson R, del Portillo M, Schmidt E, Feldman RA, Kanto WP Jr. Risk factors for necrotizing enterocolitis in infants weighing more than 2,000 grams at birth: a case-control study. Pediatrics. 1983 Jan;71(1):19-22.
- 4) Pierro A, Hall N, Ade-Ajayi A, Curry J, Kiely EM. Laparoscopy assists surgical decision making in infants with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2004 Jun;39(6):902-6.
- 5) Pierro A. The surgical management of necrotising enterocolitis. Early Hum Dev. 2005 Jan;81(1):79-85.
- 6) Emir H, Akman M, Belce A, Gumustas K, Soylet Y. Is intestinal ischemia a risk of laparoscopy? An experimental study in rabbits. Eur J Pediatr Surg. 2001 Jun;11(3):158-62.
- 7) Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. In: O'Neill JA, et al. (eds): Pediatric Surgery. 5th ed., St. Louis, Mosby-Year Book Inc.; 1998: 1297-320.
- 8) 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 Oct;9(5):587-95.
- 9) Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. Surgery. 1975 May;77(5):687-90.
- 10) 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 Jan;187(1):1-7.
- 11) Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. Pediatr Clin North Am. 1986 Feb;33(1):179-201.

- 12)** Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr.* 2001 Apr;13(2):111-5.
- 13)** Aslan Y, Ayvaz A, Yıldırım A, ve ark. Nekrotizan enterokolit: 62 olgunun değerlendirilmesi. *Pediyatrik Cerrahi Dergisi* 2001; 15: 20-27.
- 14)** Günşar C, Çün S, Etensel B, Ceylan H, Şencan A, Mir E. Nekrotizan enterokolit: 35 olguda insidans, tanı kriterleri, risk faktörleri, tedavi ve mortalite değerleri. *Ege Pediyatri Bülteni* 2003; 10 (1): 1-6.
- 15)** Llanos AR, Moss ME, Pinzon MC, Dye T, Sinkin RA, Kendig JW. Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2002 Oct;16(4):342-9.
- 16)** Teasdale F, Le Guennec JC, Bard H, Perreault G, Doray B. Neonatal necrotizing enterocolitis: the relation of age at the time of onset to prognosis. *Can Med Assoc J.* 1980 Sep 6;123(5):387-90.
- 17)** Stoll BJ. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clinics in perinatology,* 1994, 21(2): 205-18.
- 18)** Newell SJ. Gastro intestinal disorders: Necrotizing enterocolitis. In: Rennie JM, Robertson NRC(eds.): *Textbook of Neonatology.* 3rd ed., Churchill Livingstone, 1999: 747-55.
- 19)** Kazez A, Kucukaydin N, Kucukaydin M, Kontas O, Okur H, Dogan P. A model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the role of distension. *J Pediatr Surg.* 1997 Oct;32(10):1466-9.
- 20)** Okur H, Kucukaydin M, Kose K, Kontas O, Dogan 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 Oct;30(10):1416-9.
- 21)** Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, Stepankova R, Payne CM, McCuskey RS. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Jan;282(1): 156-64.
- 22)** Pellegrini M, Lagrasta N, Garcia Garcia C, Campos Serna J, Zicari E, Marzocca G. Neonatal necrotizing enterocolitis: a focus on. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2002 Jan-Feb;6(1):19-25.
- 23)** Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med.* 1984 Apr 26;310(17):1093-103.

- 24)** Chan SY, Chan KL. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann. Coll. Surg. H.K.* 2001 (5): 52-54.
- 25)** Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T, Walsh JH, Taylor IL. Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr.* 1985 Mar;106(3):467-71.
- 26)** Israel EJ. Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;396:27-32.
- 27)** Coutinho HB, da Mota HC, Coutinho VB, Robalinho TI, Furtado AF, Walker E, King G, Mahida YR, Sewell HF, Wakelin D. Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotising enterocolitis. *J Clin Pathol.* 1998 Jul;51(7):512-4.
- 28)** Lloyd JR. The etiology of gastrointestinal perforations in the newborn. *Pediatr Surg.* 1969 Feb;4(1):77-84.
- 29)** Powell RW, Dyess DL, Collins JN, Roberts WS, Tacchi EJ, Swafford AN Jr, Ferrara JJ, Ardell JL. Regional blood flow response to hypothermia in premature, newborn, and neonatal piglets. *J Pediatr Surg.* 1999 Jan;34(1):193-8.
- 30)** Covert RF, Neu J, Elliott MJ et al. Factors associated with age of onset of necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol.* 1989; 6:455-60.
- 31)** Nowicki PT, Nankervis CA. The role of the circulation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol.* 1994 Jun;21(2):219-34.
- 32)** Salman FT. Yenidoğanlarda nekrotizan enterokolitler. *İst. Tıp Fak. Mecm.* 1985 48: 578-84.
- 33)** Rand T, Weninger M, Kohlhauser C, Bischof S, Heinz-Peer G, Trattinig S, Popow C, Salzer HR. Effects of umbilical arterial catheterization on mesenteric hemodynamics. *Pediatr Radiol.* 1996 Jul;26(7):435-8.
- 34)** Özbey H, Boneval C, Alkac U, Bavbek BG, Cakıroğlu G, Salman T, Celik A. The effect of polycythemic hyperviscosity on ischemic bowel necrosis. *Pediatr Surg Int* 1996 Jan;11(8):547-9.
- 35)** Nowicki P. Intestinal ischemia and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1990 Jul;117(1 Pt 2):14-9.
- 36)** Crissinger KD, Kvietys PR, Granger DN. Developmental intestinal vascular responses to venous pressure elevation. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 1):658-63.

- 37)** Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic faecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr.* 1977 Aug;91(2):298-301.
- 38)** Chan KL, Ho JC, Chan KW, Tam PK. A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2002 Oct;37(10):1435-40.
- 39)** Lawrence G, Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1982 Jan 16;1(8264):137-9.
- 40)** Peter CS, Feuerhahn M, Bohnhorst B, Schlaud M, Ziesing S, von der Hardt H, Poets CF. Necrotising enterocolitis: is there a relationship to specific pathogens? *Eur J Pediatr.* 1999 Jan;158(1):67-70.
- 41)** Kliegman RM. The relationship of neonatal feeding practices and the pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 2003 Mar;111(3):671-2.
- 42)** Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1990 Jul;117(1 Pt 2):2-5.
- 43)** Neu J, Chen M, Beierle E. Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005 Aug;14(3):137-44.
- 44)** Finer NN, Peters KL, Hayek Z, Merkel CL. Vitamin E and necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 1984 Mar;73(3):387-93.
- 45)** Tuladhar R, Daftary A, Patole SK, Whitehall JS. Oral gastrografen in neonates: a note of caution. *Int J Clin Pract.* 1999 Oct-Nov;53(7):565.
- 46)** Alpan G, Eyal F, Vinograd I, Udassin R, Amir G, Mogle P, Glick B. Localized intestinal perforations after enteral administration of indomethacin in premature infants. *J Pediatr.* 1985 Feb;106(2):277-81.
- 47)** Kuhl G, Wille L, Bolkenius M, Seyberth HW. Intestinal perforation associated with indomethacin treatment in premature infants. *Eur J Pediatr.* 1985 Jan;143(3):213-6.
- 48)** Fujii AM, Brown E, Mirochnick M, O'Brien S, Kaufman G. Neonatal necrotizing enterocolitis with intestinal perforation in extremely premature infants receiving early indomethacin treatment for patent ductus arteriosus. *J Perinatol.* 2002 Oct-Nov;22(7):535-40.
- 49)** Nowicki PT, Oh W. Methylxanthines and necrotizing enterocolitis revisited. *J*

Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989 Aug;9(2):137-8

50) Czyrko C, Del Pin CA, O'Neill JA Jr, Peckham GJ, Ross AJ 3rd. Maternal cocaine abuse and necrotizing enterocolitis: outcome and survival. J Pediatr Surg. 1991 Apr;26(4):414-8; discussion 419-21

51) Buyukunal C, Kilic N, Dervisoglu S, Altug T. Maternal cocaine abuse resulting in necrotizing enterocolitis--an experimental study in a rat model. Acta Paediatr Suppl. 1994;396:91-3.

52) Kilic N, Buyukunal C, Dervisoglu S, et al.: Maternal cocaine abuse resulting in necrotizing enterocolitis. An experimental study in a rat model. II. Results of perfusion studies. Pediatr Surg Int 2000, 16:176-8.

53) Hsueh W, Caplan MS, Sun X, Tan X, MacKendrick W, Gonzalez-Crussi F. Platelet-activating factor, tumor necrosis factor, hypoxia and necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr Suppl. 1994;396:11-7.

54) Caplan MS, Kelly A, Hsueh W. Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. Pediatr Res. 1992 May;31(5):428-34.

55) Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW, Johnston JM. The central role of PAF in necrotizing enterocolitis development. Adv Exp Med Biol. 1997;407:379-82.

56) Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. Am J Pathol. 1983 Jul;112(1):127-35.

57) Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. Pediatr Dev Pathol. 2003 Jan-Feb;6(1):6-23.

58) Caplan MS, Hsueh W. Necrotizing enterocolitis: role of platelet activating factor, endotoxin, and tumor necrosis factor. J Pediatr. 1990 Jul;117(1 Pt 2):S47-51.

59) Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. Clin Perinatol. 1994 Jun;21(2):235-46.

60) Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW, Johnston JM. The central role of PAF in necrotizing enterocolitis development. Adv Exp Med Biol. 1997;407:379-82.

61) Kilbourn RG, Traber DL, Szabo C. Nitric oxide and shock. Dis Mon. 1997 May;43(5):277-348.

62) Czapski G, Goldstein S. The role of the reactions of .NO with superoxide and

oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med*. 1995 Dec;19(6):785-94.

63) Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 1997 Feb;32(2):275-82.

64) Njalsson R, Norgren S. Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatr*. 2005 Feb;94(2):132-7.

65) Hall NJ, Ali J, Pierro A, Eaton S. Total glutathione is not decreased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2005 May;40(5):769-73.

66) Bhaskar L, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical-induced damage during colonic ischemia/reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem*. 1995 Oct 4;151(1):9-14.

67) Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr*. 1990 Jul;117(1 Pt 2):6-13.

68) Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 1995 Nov;4(4):200-6.

69) Pellegrini M, Lagrasta N, Garcia Garcia C, Campos Serna J, Zicari E, Marzocca G. Neonatal necrotizing enterocolitis: a focus on. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2002 Jan-Feb;6(1):19-25.

70) Kien CL. Colonic fermentation of carbohydrate in the premature infant: possible relevance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1990 Jul;117(1 Pt 2):52-8.

71) Yeker D. Nekrotizan enterokolit. İçinde: Yeker D. (editör) *Çocuk Cerrahisi*, 1. Baskı, İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti.; 2005: 327-31

72) Kosloske AM. Necrotizing enterocolitis. In: Donellan WL, Burrington JD, Kimura K, Schafer JC, White JJ (eds): *Abdominal Surgery of Infancy and Childhood*. 2nd edition. Ann Arbor, Harwood Academic Publishers GmbH; 2001: 21/1-21/14.

73) Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol*. 2003 Dec;8(6):449-59.

74) Henry MC, Lawrence Moss R. Surgical therapy for necrotizing enterocolitis: bringing evidence to the bedside. *Semin Pediatr Surg*. 2005 Aug;14(3):181-90.

75) Kissewetter WB, Taghizadeh F, Bower RJ. Necrotizing enterocolitis: is there a place for resection and primary anastomosis? *J Pediatr Surg*. 1979 Jun;14(3):360-3.

76) Fasoli L, Turi RA, Spitz L, Kiely EM, Drake D, Pierro A. Necrotizing

enterocolitis: extent of disease and surgical treatment. J Pediatr Surg. 1999 Jul;34(7):1096-9.

77) Sparnon AL, Kiely EM. Resection and primary anastomosis for necrotising enterocolitis. Pediatr Surg Int (1987) 2:101-4.

78) Vaughan WG, Grosfeld JL, West K, Scherer LR 3rd, Villamizar E, Rescorla FJ. Avoidance of stomas and delayed anastomosis for bowel necrosis: the 'clip and drop-back' technique. J Pediatr Surg. 1996 Apr;31(4):542-5.

79) Lessin MS, Schwartz DL, Wesselhoeft CW Jr. Multiple spontaneous small bowel anastomosis in premature infants with multisegmental necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2000 Feb;35(2):170-2.

80) Moore TC. Successful use of the "patch, drain, and wait" laparotomy approach to perforated necrotizing enterocolitis: is hypoxia-triggered "good angiogenesis" involved? Pediatr Surg Int. 2000;16(5-6):356-63.

81) Ein SH, Marshall DG, Girvan D. Peritoneal drainage under local anesthesia for perforations from necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 1977 Dec;12(6):963-7.

82) Zenciroglu A, Cakmak O, Demirel N, Bas AY, Yilmaz D, Karaman I, Erdogan D. Outcome of primary peritoneal drainage for perforated necrotizing enterocolitis: comparison between laparotomy and drainage. Eur J Pediatr Surg. 2005 Aug;15(4):243-7.

83) Azarow KS, Ein SH, Shandling B, Wesson D, Superina R, Filler RM. Laparotomy or drain for perforated necrotizing enterocolitis: who gets what and why? Pediatr Surg Int. 1997 Mar 21;12(2/3):137-9.

84) Morgan LJ, Shochat SJ, Hartman GE. Peritoneal drainage as primary management of perforated NEC in the very low birth weight infant. J Pediatr Surg. 1994 Feb;29(2):310-4; discussion 314-5.

85) Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10.

86) Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959 May;82(1):70-7

87) Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. Methods Enzymol. 1996;268:237-46.

88) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):267-72.

- 89)** Tan KL, Tan AY, Wong TT. Necrotizing enterocolitis in young infants: five examples. Clin Pediatr (Phila). 1972 Jan;11(1):44-8.
- 90)** Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC, Gongaware RD, Wigger J, Barlow B, Blanc WA, Berdon WE. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. Pediatrics. 1975 Mar;55(3):376-87.
- 91)** Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W. Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. Pediatr Res. 1985 May;19(5):466-71.
- 92)** Cohen IT, Nelson SD, Moxley RA, Hirsh MP, Counihan TC, Martin RF. Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. J Pediatr Surg. 1991 May;26(5):598-601.
- 93)** Temiz A. Deneysel neonatal nekrotizan enterokolit modelinde stabil prostasiklin analogu olan İloprostun etkisi (Uzmanlık Tezi). İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2001.
- 94)** Bilgiç MB. Deneysel neonatal nekrotizan enterokolit modelinde Bombesinin barsak mukozası üzerine etkisi (Uzmanlık Tezi). İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2003.
- 95)** Özkan KU, İnanç F, Kılınç M, Boran Ç. Leptin Tedavisi Yeni Doğan Rat İncebarsağında Hipoksi/Reoksijenasyon Hasarına Karşı Koruyucu mudur? Fırat Tıp Dergisi. 2005;10(1): 5-9.
- 96)** Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R: Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. Gastroenterol. 1999;(117):577-83.
- 97)** Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol. 1991 Feb;3(1):65-70.
- 98)** Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. Circulation. 1993 Nov;88(5 Pt 1): 2451-4.
- 99)** Bartosz G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. Acta Biochim Polon. 1996; 43: 645-60.
- 100)** Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. J Pharmacol Exp Ther. 1994 Mar;268(3):1114-21.
- 101)** Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. 2006.

<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>

102) Tunçtan B. Nitrik Oksit Sentaz ve Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri. Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı, Nitrik Oksidin Farmakolojisi. Mayıs 2005 Mersin; http://www.tfd.org.tr/mersin_bahar2.pdf

103) Crissinger KD. Understanding necrotizing enterocolitis-promising directions . Pathophysiology. 1999 (5): 247-56.

104) Kelly N, Friend K, Boyle P, Zhang XR, Wong C, Hackam DJ, Zamora R, Ford HR, Upperman JS. The role of the glutathione antioxidant system in gut barrier failure in a rodent model of experimental necrotizing enterocolitis. Surgery. 2004 Sep;136(3):557-66.

105) Eaton S, Hall NJ, Pierro A. Re: letter from jeffrey upperman for journal of pediatric surgery. J Pediatr Surg. 2005 Nov;40(11):1813-4.

106) Bhatia AM, Feddersen RM, Musemeche CA. The role of luminal nutrients in intestinal injury from mesenteric reperfusion and platelet-activating factor in the developing rat. J Surg Res. 1996 Jun;63(1):152-6.

107) Jobe BA, Hunter JG. Minimally-invasive surgery. In: Brunickardi FC, et al. (eds.): Schwartz's Principles of Surgery. 8th ed., New York, 2005: 379-401.

108) O'Malley C, Cunningham AJ. Physiologic changes during laparoscopy. Anesthesiol Clin North America. 2001 Mar;19(1):1-19.

109) Schilling MK, Redaelli C, Krahenbuhl L, Signer C, Buchler MW. Splanchnic microcirculatory changes during CO2 laparoscopy. J Am Coll Surg. 1997 Apr;184(4):378-82.

110) Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, Abe H, Ohtomo Y, Idezuki Y. Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery. Surgery. 1993 Sep;114(3):549-54.

111) Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, Abe H, Ohtomo Y, Idezuki Y. Changes in splanchnic blood flow and cardiovascular effects following peritoneal insufflation of carbon dioxide. Surg Endosc. 1993 Sep-Oct;7(5):420-3.

112) Rasmussen IB, Berggren U, Arvidsson D, Ljungdahl M, Haglund U. Effects of pneumoperitoneum on splanchnic hemodynamics: an experimental study in pigs. Eur J Surg. 1995 Nov;161(11):819-26.

113) Kaya Y, Coskun T, Demir MA, Var A, Ozsoy Y, Aydemir EO. Abdominal insufflation-deflation injury in small intestine in rabbits. Eur J Surg.

2002;168(7):410-7.

114) Viinamki O, Punnonen R. Vasopressin release during laparoscopy: role of increased intra-abdominal pressure. *Lancet*. 1982 Jan 16;1(8264):175-6.

115) Gutt CN, Kuntz C, Schmandra T, Wunsch A, Heinz P, Bouvy N, Bessler M, Sanger P, Bonjer J, Allendorf J, Jacobi CA, Whelan R. Metabolism and immunology in laparoscopy. First workshop on experimental laparoscopic surgery, Frankfurt, 1997. *Surg Endosc*. 1998 Aug;12(8):1096-8.

116) Cevrioglu AS, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Yilmazer M, Fenkci IV. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and ischaemic preconditioning on the generation of oxidative stress markers and inflammatory cytokines during laparoscopy in rats. *Hum Reprod*. 2004 Sep;19(9):2144-51.

117) Unsal MA, Imamoglu M, Kadioglu M, Aydin S, Ulku C, Kesim M, Alver A, Kalyoncu NI, Yaris E, Bozkaya H. The acute alterations in biochemistry, morphology, and contractility of rat-isolated terminal ileum via increased intra-abdominal pressure. *Pharmacol Res*. 2006 Feb;53(2):135-41.